

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bromatología II**



**COMPUESTOS POLIFENÓLICOS (EXTRAÍBLES Y
NO EXTRAÍBLES) EN ALIMENTOS DE LA DIETA
ESPAÑOLA: METODOLOGÍA PARA SU
DETERMINACIÓN E IDENTIFICACIÓN.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Sara Arranz Martínez

Bajo la dirección del doctor

Fulgencio Saura Calixto

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-7843-4

© Sara Arranz Martínez, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Dpto. NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II



**“COMPUESTOS POLIFENÓLICOS (EXTRAÍBLES Y NO
EXTRAÍBLES) EN ALIMENTOS DE LA DIETA ESPAÑOLA:
METODOLOGÍA PARA SU DETERMINACIÓN E
IDENTIFICACIÓN”**

SARA ARRANZ MARTÍNEZ

Madrid, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Dpto. NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II



**“COMPUESTOS POLIFENÓLICOS (EXTRAÍBLES Y NO EXTRAÍBLES) EN
ALIMENTOS DE LA DIETA ESPAÑOLA: METODOLOGÍA PARA SU
DETERMINACIÓN E IDENTIFICACIÓN”**

**Trabajo de investigación que presenta Sara Arranz Martínez para optar al Grado de
Doctor por la Universidad Complutense de Madrid (UCM)**

Vº Bueno del tutor:

Vº Bueno del director:

Vº Bueno del doctorando:

Dra. Cortes Sánchez

Dr. Fulgencio Saura Calixto

Sara Arranz Martínez

Madrid, 2010

**INSTITUTO DEL FRÍO (IF)-INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS Y NUTRICIÓN (ICTAN) (C.S.I.C.)**

Dpto. Metabolismo y Nutrición



El **Dr. Fulgencio Saura Calixto**, Profesor de Investigación del Departamento de Metabolismo y Nutrición del IF-ICTAN, CSIC, certifica que:

Sara Arranz Martínez ha realizado bajo su dirección la tesis doctoral que lleva por título:

**“COMPUESTOS POLIFENÓLICOS (EXTRAÍBLES Y NO EXTRAÍBLES) EN
ALIMENTOS DE LA DIETA ESPAÑOLA: METODOLOGÍA PARA SU
DETERMINACIÓN E IDENTIFICACIÓN”**

Fdo:

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Metabolismo y Nutrición del Instituto del Frío-ICTAN, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección del Dr. Fulgencio Saura Calixto.

Dicho trabajo de investigación se realizó dentro de los proyectos del Plan Nacional de I+D, AGL2004-07579-C04-01-ALI (*Establecimiento de bases científicas para el uso de fibra dietética antioxidante y fracciones polifenólicas de uva en la prevención de cáncer colorrectal*) y AGL2008-02541/ALI (*Elucidación del papel de complejos dietéticos indigestibles en nutrición y salud*), y gracias a la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) por el Ministerio de Ciencia e Innovación (2005/2009).

“Papá, Mamá os dedico este trabajo por el esfuerzo volcado durante toda una vida a mi lado, gracias”.

“A mi hermana, mi apoyo incondicional”.

“A Rober por dar luz en mi camino”

AGRADECIMIENTOS

El paso de estos cuatro años en el Instituto del Frío me ha dado la oportunidad de vivir muchos momentos dignos de recordar. Casi siempre estos momentos van asociados al recuerdo de personas que no hacen indiferente el paso del tiempo. Por esta razón son muchos los agradecimientos que he de nombrar:

En primer lugar agradezco al Ministerio de Ciencia e Innovación por la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador (FPI) que me ha permitido realizar este Trabajo que aquí se presenta.

Gracias a mi director de Tesis, el Profesor Fulgencio Saura Calixto, por confiar en mi y guiarme en el mundo de la investigación, por su apoyo y enseñanzas.

Gracias a M^a Rosa Redondo e Isabel Fernández por su apoyo técnico y por hacer más sencillo lo que al comienzo resultaba complicado.

Quiero agradecer también a la Dra. Isabel Goñi de la Unidad Asociada de Salud Gastrointestinal de la Facultad de Farmacia por apoyarme en el último tramo.

Especialmente quiero agradecer a mis compañeros de grupo que encontré nada más llegar y gracias a los cuales lo desconocido se hizo apasionante. José que siempre tenía la respuesta a mis dudas y quien siempre te brindará su mejor cara. María, que siempre ponía la nota alegre en el laboratorio (¡cuanto he echado de menos tu música!) y siempre tenía una idea original. M^a Elena, tú y tu gran capacidad, gracias por las charlas tan “friquis” de polifenoles. Jara contigo empecé mano a mano en el laboratorio, gracias por tus consejos y tu orden.

A José Manuel, recién llegado al grupo y con quien he compartido experimentos, risas y dilemas de tesis. Ánimo a ti también que ya estamos en la recta final.

Por supuesto no me olvido del resto de compañeros que forman parte del departamento y de los que también guardo mis mejores recuerdos. Irene, gracias por estar siempre ahí, por tu fuerza y tú buen hacer. Lecumberri, que siempre me ofreciste tu amabilidad y tu cariño. Raquel, eres increíble y divertida. Anita que tan buenos momentos hemos compartido dentro y fuera del Frío, gracias por tu amistad. Siempre echaremos unas risas cuando recordemos lo que hemos vivido.

A Luis, Nines, Sonia y Laura por hacer que el café sea imprescindible para continuar. Siempre ofrecéis palabras de ánimo y nos hacéis ver que ciencia y vida pueden compaginarse. Sois admirables por el esfuerzo y tesón con el que trabajáis.

Ha sido un verdadero placer compartir momentos en esta etapa con personas que vinieron desde tan lejos con el objetivo de hacer realidad un sueño. Habéis sido un punto y a parte en nuestras vidas. Lupita+Aidé y Deisy gracias por demostrar que el esfuerzo vale la pena.

A las nuevas generaciones que comienzan pisando fuerte. Ilde no cambies nunca, eres estupendo. Miren con quien comparto mis días buenos y los que no lo son tanto, gracias por estar codo a codo. La otra Sara, gracias por tus ánimos y tu optimismo. Arancha y Eva con quien empiezo a compartir desayunos y charlas.

No quiero olvidar a las personas que pasaron brevemente por el Frío pero con los que viví gratos momentos: Nacho, Inma, Cristina, Benoit, Toni, Gema, Gabi, Maris... y seguro que alguno más, que ya pierdo la cuenta.

Quiero también agradecer el apoyo y amabilidad que siempre me han ofrecido la Dra. Pilar Rupérez y el Dr. Antonio Jiménez.

A la gente de la USTA, Miguel Ángel e Inma, porque con ellos he aprendido mucho de Masas.

A Pilar, Paquita y otros compañeros con los que hemos compartido una sonrisa o unas palabras de ánimo por los pasillos.

A la Dra. Cortes Sánchez y al resto del departamento de Nutrición y Bromatología II de la Facultad de Farmacia por ofrecerme siempre su apoyo y su coordinación.

Mencionar al Dr. Arturo Cert y el Dr. Paul Kroon por aceptarme en sus respectivos laboratorios durante mis estancias en Sevilla y Norwich. Tuve el placer de conocer gente estupenda y de vivir experiencias inolvidables. ¡Mereció la pena!

Pero sin duda, es a mi familia, mis padres y mi hermana, a quien doy las gracias por todo su esfuerzo a lo largo de una vida. A ellos en especial les dedico esta Tesis porque han vivido lo bueno y lo malo de este proyecto. Porque siempre estaréis a mi lado, os quiero.

Mis abuelitos que siempre me animan y se preocupan por mí. Porque como ellos dicen, el conocimiento es progreso.

Antonia, Isidoro, Javi, Noelia y Nerea sois también un gran apoyo y en quien he encontrado una nueva familia.

Mis amigas de toda la vida que me entienden y siempre estarán ahí (Mónica, Silvia, Cristina, Ana, María, Ester).

Y a ti, Rober, te dedico las últimas líneas porque este trabajo ha sido compartido contigo desde el principio y no hubiera sido posible sin tu comprensión y tus constantes ánimos. Porque esta etapa forma parte de nuestros sueños, aquellos que un día decidimos poner en común.

“El tiempo es el mejor autor, siempre encuentra el final perfecto”.

Charles Chaplin

LISTA DE PUBLICACIONES ORIGINALES

Esta tesis doctoral se ha presentado según el formato de publicaciones dando lugar a seis artículos coincidentes con los seis capítulos que se presentan en el apartado de resultados.

Además se recogen como Anexo II otras publicaciones que por estar relacionadas con los temas que se abordan en esta Memoria de Tesis Doctoral pueden tener importancia en el contexto de Nutrición y Metabolismo.

PUBLICACIONES PRINCIPALES:

I. **Arranz, S.**, Saura-Calixto, F., Shaha, S. y Kroon, P.A. High contents of non-extractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated (*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7298–7303, 2009).

II. Pérez-Jiménez, J., **Arranz, S.** y Saura-Calixto, F. Proanthocyanidin content in foods is largely underestimated in the literature data. An approach to quantification of the missing proanthochyanidins (*Food Research International*, 42, 1381–1388, 2009).

III. **Arranz, S.** & Saura-Calixto, F. Analysis of polyphenols in cereals may be improved performing acidic hydrolysis: a study in wheat flour and wheat bran and cereals of the diet (*Journal of Cereal Science*, 2010, 51, 313-318).

IV. **Arranz, S.**, Pérez-Jiménez, J. y Saura-Calixto, F. Antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.): contribution of oil and defatted matter (*European Food Research and Technology*, 227:425–431, 2008).

V. **Arranz, S.**, Cert, R., Pérez-Jiménez, J., Cert, A. y Saura-Calixto, F. Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils (*Food Chemistry* 110, 985–990, 2008).

VI. **Sara Arranz**, Jose Manuel Silván y Fulgencio Saura-Calixto. Non extractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols. A study on the spanish diet. (*Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 54, in press. DOI:10.1002/mnfr.200900580)

OTRAS PUBLICACIONES:

VII. Sáyago-Ayerdi, S., Arranz, S., Serrano, J. y Goñi, I. “Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus Sabdariffa* L.) beverage” (Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55, 7886-7890).

VIII. Pérez-Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, Díaz-Rubio ME, Serrano J, Goñi I, Saura-Calixto F. “Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results” (Food Research International, 41, 2008, 274-85).

IX. Pérez-Jiménez J, Serrano J, Tabernero M, Arranz S, Díaz-Rubio ME, García-Diz L, Goñi I, Saura-Calixto F. “Effects of Grape Antioxidant Dietary Fiber on cardiovascular disease risk factors” (Nutrition, 2008, 24(7-8), 646-653).

X. Pérez-Jiménez J, Serrano J, Tabernero M, Arranz S, Díaz-Rubio ME, García-Diz L, Goñi I, Saura-Calixto F. “Bioavailability of Phenolic Antioxidants Associated with Dietary Fiber: Plasma Antioxidant Capacity After Acute and Long-Term Intake in Humans”. (Plant Foods Human Nutrition, 2009, 64, 102–107).

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
--------------------	---

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. DIFERENTES TIPOS DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS Y EFECTOS EN SALUD (ESTUDIOS EN HUMANOS)	5
1.2. METODOLOGÍA EXISTENTE PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EXTRAÍDOS DE ALIMENTOS	15
1.3. CONTRIBUCIÓN DE LA TESIS A LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN LA DIETA	21

2. OBJETIVOS	23
--------------------	----

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

► I: DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EXTRAÍBLES Y NO EXTRAÍBLES EN FRUTAS Y CEREALES.

I. 1. Introducción	25
I. 2. CAPÍTULO 1: HIGH CONTENTS OF NON-EXTRACTABLE POLYPHENOLS IN FRUITS SUGGEST THAT POLYPHENOL CONTENTS OF PLANT FOODS HAVE BEEN UNDERESTIMATED (<i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> , 57, 7298–7303, 2009)	27
I. 3. CAPÍTULO 2: PROANTHOCYANIDIN CONTENT IN FOODS IS LARGELY UNDERESTIMATED IN THE LITERATURE DATA. AN APPROACH TO QUANTIFICATION OF THE MISSING PROANTHOCYANIDINS (<i>Food Research International</i> , 42, 1381–1388, 2009).	35
I. 4. CAPÍTULO 3: ANALYSIS OF POLYPHENOLS IN CEREALS MAY BE IMPROVED PERFORMING ACIDIC HYDROLYSIS: A STUDY IN WHEAT FLOUR AND WHEAT BRAN AND CEREALS OF THE DIET (<i>Journal of Cereal Science</i> , en prensa).	45
I. 5. Conclusiones	61

► II: DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN FRUTOS SECOS Y ACEITES CONSUMIDOS EN LA DIETA ESPAÑOLA

II. 1. Introducción	63
II. 2. CAPITULO 4: ANTIOXIDANT CAPACITY OF WALNUT (JUGLANS REGIA L.): CONTRIBUTION OF OIL AND DEFATTED MATTER (<i>European Food Research and Technology</i> , 227:425–431, 2008).	65
II. 3. CAPITULO 5: COMPARISON BETWEEN FREE RADICAL SCAVENGING CAPACITY AND OXIDATIVE STABILITY OF NUT OILS (<i>Food Chemistry</i> 110, 985–990, 2008).	73
II. 4. Conclusiones	81

► III: INGESTA DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN LA DIETA ESPAÑOLA

III. 1. Introducción	83
III. 2. CAPITULO 6: NON EXTRACTABLE POLYPHENOLS, USUALLY IGNORED, ARE THE MAJOR PART OF DIETARY POLYPHENOLS. A STUDY ON THE SPANISH DIET (<i>Molecular Nutrition and Food Research</i> , en revisión).	85
III. 3. Conclusiones	109

4. DISCUSIÓN GENERAL	111
5. CONCLUSIONES GENERALES	115
6. ANEXO I: METODOLOGÍA	117
7. ANEXO II: OTRAS PUBLICACIONES	125
8. BIBLIOGRAFÍA	167

ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

PE: Polifenoles extraíbles

PNE: Polifenoles no extraíbles

PA: Proantocianidinas

PAE: Proantocianidinas extraíbles

PANE: Proantocianidinas no extraíbles

PH: Polifenoles hidrolizables

TH: Taninos hidrolizables

TC: Taninos consensados

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)

DPPH: 2,2-Dyphenyl-1-picrylhydrazil

ORAC: Oxygen radical absorbance capacity

FRAP: Ferric ion reducing antioxidant power

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DIFERENTES TIPOS DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS Y EFECTOS EN SALUD (ESTUDIOS EN HUMANOS).

Los compuestos polifenólicos son los compuestos bioactivos antioxidantes más abundantes en la dieta. Se trata de un amplio grupo de compuestos, producto del metabolismo secundario de las plantas (**Figura 1**), donde desempeñan diversas funciones de protección al ataque de patógenos o herbívoros y son pigmentos que atraen a los polinizadores. Poseen estructuras con anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados a partir de los cuales ejercen su acción antioxidante.

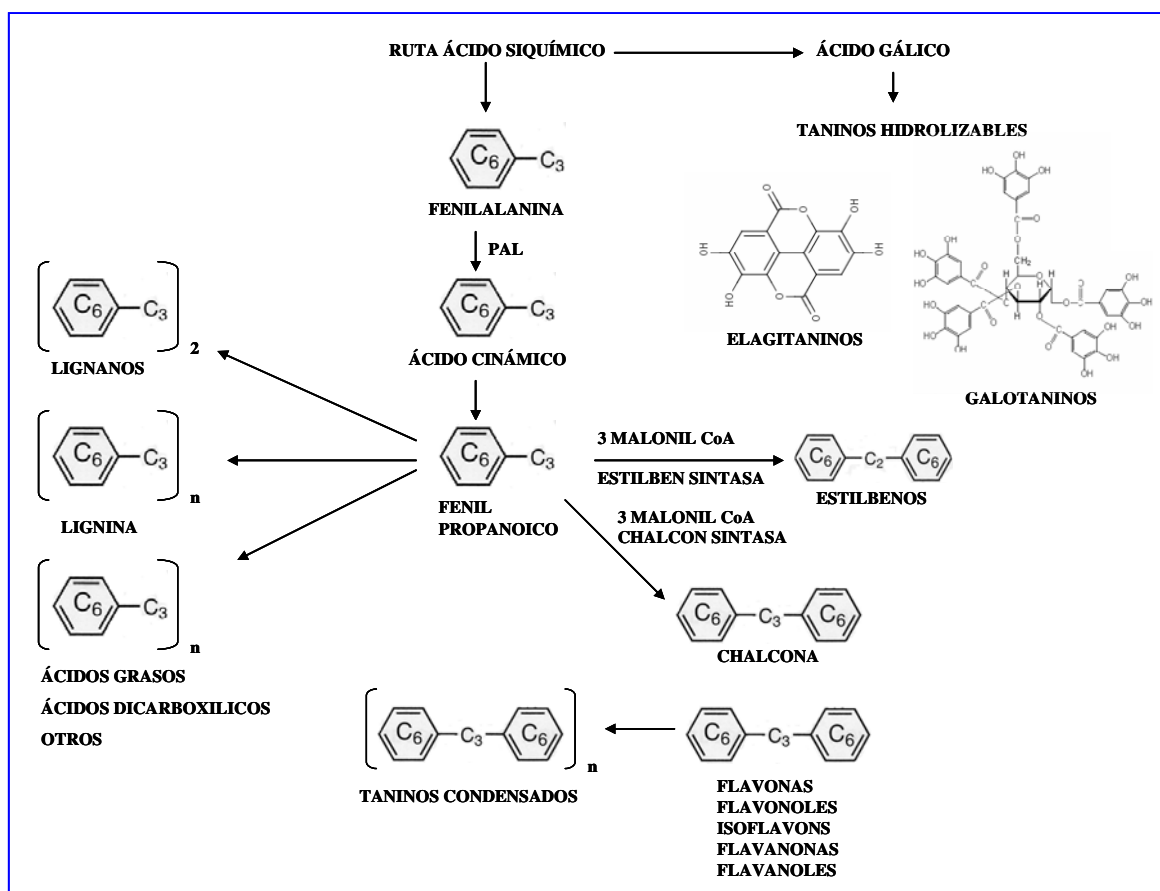


Figura 1. Producción de flavonoides y estilvenos a partir de cumaril CoA y malonil CoA (Shahidi, y Nacz, 2004).

Pueden también aparecer en formas conjugadas (glicósidos) con uno o más restos de azúcares unidos a grupos hidroxilo o directamente al anillo aromático aunque también pueden encontrarse asociados a otros compuestos (Manach y Donovan, 2004).

Los compuestos polifenólicos presentes en alimentos se extraen generalmente con disolventes acuoso-orgánicos.

La extracción dependerá de la naturaleza química y del grado de polimerización de los propios compuestos, del método de extracción (polaridad de los solventes), del tamaño de partícula de la muestra y de las sustancias que pueden ejercer un efecto de interferencia. A veces se requieren pasos adicionales o previos a la extracción para eliminar sustancias no deseadas que pueden interferir en nuestros análisis (grasa, carbohidratos, clorofilas) normalmente mediante extracción en fase sólida (*Robins, 2003*). En general cualquier proceso está basado en una primera extracción con disolventes orgánicos o la mezcla de algunos de ellos (metanol, etanol, propanol, acetona, agua, dimetilformamida, acetato de etilo) obteniéndose en el extracto una mezcla de diferentes compuestos polifenólicos (*Antolovich, y col., 2000*). Además de los disolventes, también el tiempo de extracción es determinante a la hora de obtener un mayor rendimiento. Se han reportado tiempos de extracción desde 1 minuto a 24 horas (*Price y col., 2008; Cork y Krockengerg, 1991; Burns, 1971; Maxsón y Rooney, 1972*), teniendo en cuenta que largos periodos de extracción pueden producir oxidaciones, que se minimizan añadiendo agentes reductores (*Khanna y col., 1968*).

Las condiciones de extracción y la selección de los disolventes dependerán del tipo de muestra y de la naturaleza de los compuestos que queramos extraer. Así, *Shahidi, y col., (1991)* and *Naczky y col., (1992)* encontraron que la extracción en dos pasos secuenciales con acetona al 70% era suficiente para la extracción de taninos. *Desphande y Cheryan, (1985)* publicó que el tiempo óptimo de extracción de polifenoles era de 50-60 minutos (*Krygier y col., 1982*) utilizaron la mezcla de metanol/acetona/agua (7:7:6) a temperatura ambiente para la extracción de compuestos polifenólicos libres y esterificados. También es habitual encontrar en bibliografía la utilización de disolventes acidificados (metanol/HCl) para una mayor extracción y estabilidad de compuestos como las antocianidinas (*Cacace y Mazza, 2002; Ju y Howard, 2003*) y proantocianidinas (*Deshpande y Cheryan, 1985; Price, y col., 1978*). *Matilla y col., (2000)* extrajeron flavonoides de material vegetal con metanol acuoso al 62.5% acidificado con HCl (1:4) para hidrolizar los enlaces éster de glicósidos de flavonoides. (*Arts y col., 2000*) utilizaron metanol acuoso al 70% y al 90% para extraer catequinas. Las antocianidinas son extraídas normalmente con disolventes orgánicos acidificados, normalmente metanol que destruye las membranas celulares extrayendo este tipo de compuestos a la vez desestabilizarlos (*Moore y col., 1982*). Otros autores proponen el

uso de agua/H₂SO₄ para la extracción de antocianidinas (*Cacace y Mazza, 2002*). La aplicación de altas temperaturas con disolventes acidificados también puede ser efectivo para la extracción de este tipo de polifenoles (*Ju y Howard, 2003*). Algunas proantocianidinas (PA) de bajo peso molecular son extraídas con disolventes acuoso-orgánicos acidificados. Como ejemplos encontramos el uso de diferentes mezclas acetona/agua (70:30; 60:40) o metanol al 1% HCl (*Prior y col., 2001; Guyot y col., 2001; Labarbe y col., 1999; Naczek & Shahidi, 1989*). Para la extracción de taninos hidrolizables se han utilizado como disolventes agua (temperatura ambiente o 90°C), 50% metanol, 50-70% acetona o etanol/agua en diferentes proporciones (*Beecher, 2003; Mueller-Harvey, 2001; Clifford y Scalbert, 2000; Okuda y col., 1990*). Su extracción depende del grado de polimerización de este tipo de compuestos y del tipo de matriz.

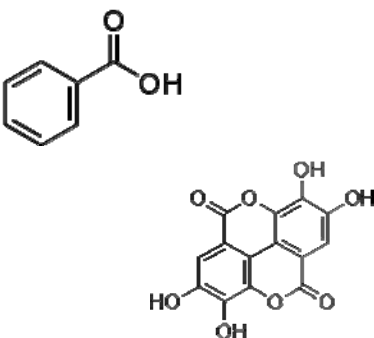
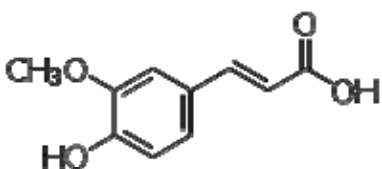
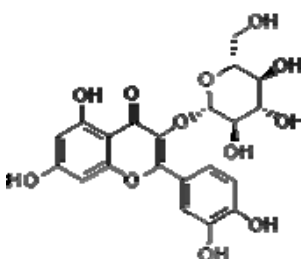
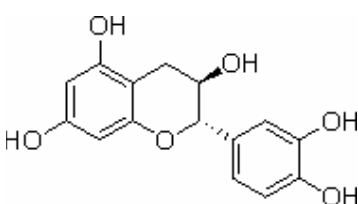
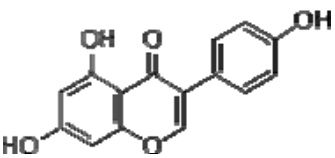
Independientemente del tipo de disolventes que se utilicen, la extracción siempre es incompleta y una cantidad de compuestos polifenólicos puede quedar en los residuos de la extracción. Por ello, de acuerdo a lo anteriormente expuesto, los compuestos polifenólicos se pueden dividir en polifenoles extraíbles (PE), aquellos que se solubilizan en los disolventes acuoso-orgánicos y polifenoles no extraíbles (PNE), los que quedan retenidos en el residuo resultante tras la extracción acuoso-orgánica. Los compuestos extraíbles poseen pesos moleculares bajos o medios (de monómeros a decámeros) mientras que los no extraíbles son compuestos con un peso molecular elevado (5000 unidades o mayores) o polifenoles de bajo peso molecular unidos a los componentes de la matriz de la fibra dietética o a proteínas que se encuentran en los residuos de dicha extracción acuoso-orgánica (*Bravo y col., 1994; Saura-Calixto y col., 1991*) o también pueden quedar atrapados en la matriz vegetal inaccesibles a los disolventes.

Según su estructura química los **compuestos extraíbles** además pueden dividirse en estructuras simples como son los ácidos fenólicos que a su vez pueden encontrarse libres o esterificados, en flavonoides y en otras estructuras mucho más complejas que a su vez se subdividen en proantocianidinas de bajo peso molecular (oligómeros de catequina y epicatequina con grado de polimerización entre 2 y 10) y taninos hidrolizables. Los **polifenoles no extraíbles** incluyen también taninos hidrolizables que a su vez pueden dividirse en galotaninos si la unidad monomérica es el ácido gálico y en

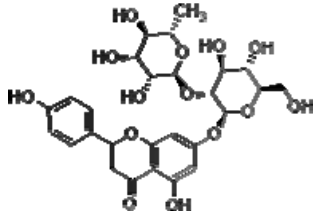
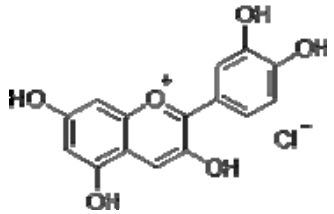
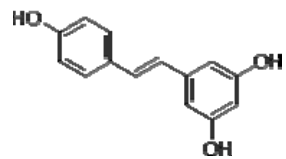
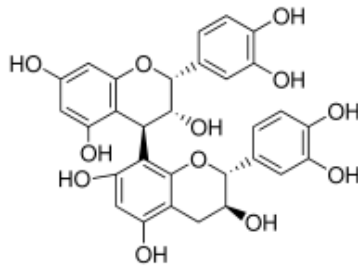
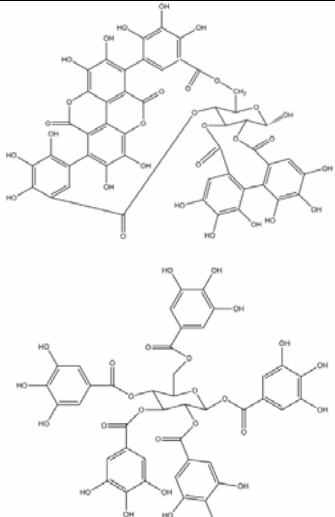
elagitaninos si es el ácido elágico o su dimero de condensación, el ácido hexahidroxidifenico (HHDF), polifenoles hidrolizables (ácidos benzoicos y ácidos cinámicos que se unen a estructuras más complejas mediante enlaces glicosídicos) y proantocianidinas de alto peso molecular o también llamados taninos condensados. La **Tabla 1** reúne los compuestos polifenólicos, según solubilidad, más comunes encontrados en alimentos de origen vegetal.

Tabla 1. Compuestos polifenólicos extraíbles y no extraíbles más comunes en alimentos vegetales.

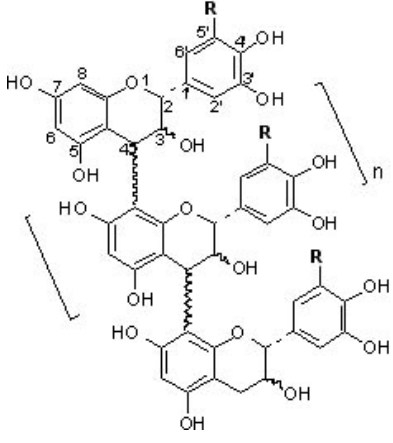
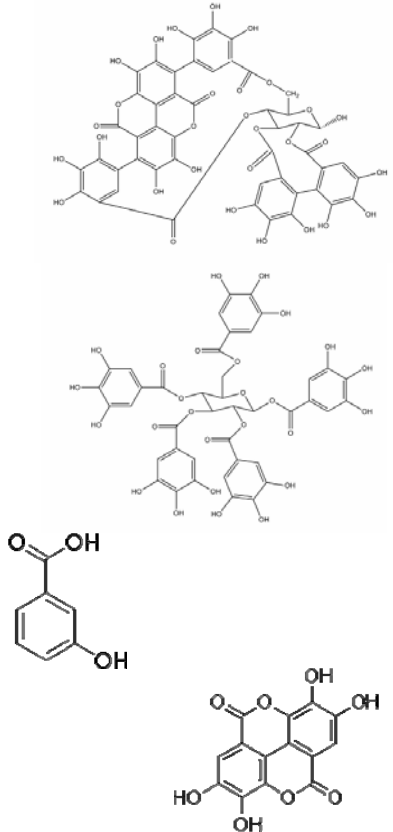
A) Extraíbles

POLIFENOLES EXTRAÍBLES (PE)		ESTRUCTURA
ÁCIDOS BENZOICOS	<p>Ácido <i>p</i>-hidroxibenzoico</p> <p>Ácido gálico</p> <p>Ácido protocatéquico</p> <p>Ácido vanílico</p> <p>Ácido sirínico</p> <p>Ácido elágico</p> <p>Ácido tánico</p> <p>Ácido gentísico</p>	
ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS	<p>Ácido clorogénico</p> <p>Ácido cafeico</p> <p>Ácido ferúlico</p> <p>Ácido sinápico</p> <p>Ácido <i>trans</i>-cinámico</p>	
FLAVONOLES	<p>Rutina</p> <p>Quercetina</p> <p>Miricetina</p> <p>Kaemferol</p> <p>Glucosidos de quercetina</p>	
FLAVANOLES	<p>Catequina</p> <p>Epicatequina</p> <p>Galocatequina</p> <p>Epicatequin galato</p> <p>Epigallocatequin galato</p> <p>Galocatequin galato</p>	
ISOFLAVONAS	<p>Daicina</p> <p>Genistina</p> <p>Daiceína</p> <p>Genisteína</p>	

INTRODUCCIÓN

FLAVANONAS	Naringenina Naringina Hesperetina Hesperidina Floridcina	
ANTOCIANIDINAS	Malvidina Cianidina Delfinidina Petunidina Glicósidos de antocianidinas	
ESTILVENOS	Resveratrol	
PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍBLES	Dímeros A, B Oligómeros (GP 3-10) Polímeros	
TANINOS HIDROLIZADOS	Oligómeros de ácidos benzoicos y ácidos hidroxicinámicos	

B) No extraíbles

POLIFENOLES NO EXTRAÍBLES (PNE)		ESTRUCTURA
<p>PROANTOCIANIDINAS NO EXTRAÍBLES O TANINOS CONDENSADOS</p>	<p>Polímeros de catequina y epicatequina</p>	
<p>POLIFENOLES HIDROLIZABLES</p>	<p>Galotaninos Elagitaninos Ácidos benzoicos Ácidos hidroxicinámicos</p>	

La estructura y cantidad de los compuestos polifenólicos está estrechamente ligada a su acción biológica ya que influirá en la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos polifenólicos y por tanto en sus efectos sobre diferentes partes del organismo humano. Para ello es necesario conocer el metabolismo que los compuestos

polifenólicos pueden sufrir en el organismo y donde pueden ejercer sus efectos. La Figura 2 muestra un esquema de este proceso.

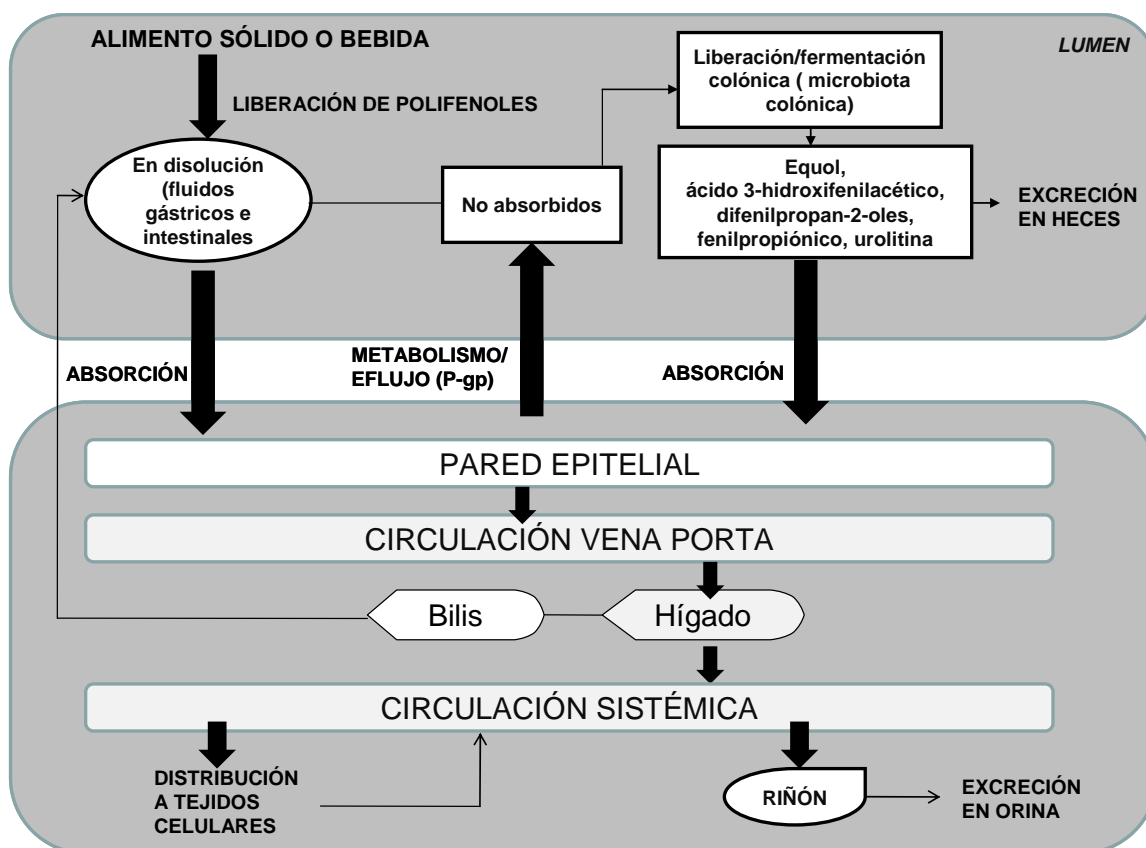


Figura 2. Metabolismo de compuestos polifenólicos de alimentos sólidos y bebidas.

Los polifenoles parecen ser absorbidos desde el tracto digestivo produciendo efectos sistémicos. Los PE absorbidos son metabolizados y tras convertirse en un nuevo compuesto glucuronidado, sulfatado o metilado son excretados en la orina y bilis (Singleton, 1981). Sin embargo, los PNE que incluyen compuestos unidos a otras moléculas y polifenoles polimerizados, no son absorbidos en el intestino delgado y por tanto pasarán a colon donde aumentarán el ambiente antioxidante o bien serán metabolizados por la microflora colónica y así serán al menos parcialmente absorbidos (Serrano y col., 2009; Tomas-Barberan y col., 2008; Spencer y col., 2000). Además, existe un metabolismo llamado eflujo que es producido por la glicoproteína-P del enterocito que hace que compuestos que han sido absorbidos puedan volver a pasar al lumen intestinal (Holst y Williamson, 2008).

Otros estudios sobre fermentación colónica de compuestos polifenólicos muestran al ácido 3-(3-hidroxifenil)-propiónico como metabolito de fermentación del ácido clorogénico, al ácido 3-fenilpropionico el de naringina, y los ácidos 3-hidroxifenilacético y 3-(3-hidroxifenil)-propiónico de la rutina. De la fermentación de flavan-3-oles (catequinas) se obtienen los ácidos difenilpropan-2-oles (*Rechner y col., 2004; Wang y col., 2000*). Otros compuestos como las isoflavonas son fermentadas produciéndose equol como metabolito mientras que el ácido elágico y los elagitaninos producen urolitina A (3,8-dihidroxi-6H-dibenzo [b,d] piran-6-ona) (*Cerdá y col., 2005*). Algunos de los metabolitos descritos para los principales constituyentes de los PNE, taninos hidrolizables y taninos condensados, son las urolitinas, ácidos gálico, ácido elágico, pirogallol y floroglucinol (*Dobroslawa y col., 2009; Whitle y col., 2003*) y dímeros y trímeros de proantocianidinas (*Tsang y col., 2005*), respectivamente.

Numerosos estudios clínicos sobre efectos de polifenoles en salud (Tabla 2) utilizan compuestos aislados o alimentos ricos en polifenoles. Sin embargo, el diseño e interpretación de los resultados se basa en los datos analíticos ya existentes de PE y no se tiene en cuenta la presencia de PNE. La estimación de PNE propuesta en esta Tesis, puede ser útil para conseguir una más completa determinación de estos compuestos así como de una mejora en los diseños de los estudios clínicos.

Tabla 2. Estudios de intervención en humanos con compuestos polifenólicos de alimentos.

Modo de administración	Compuesto polifenólico	Dosis por día	Efectos en salud	Referencia bibliográfica
Extracto de Gingo Biloba Cebolla Dieta rica en polifenoles Suplementación	Quercetina Quercetina Quercetina y kaemferol Quercetina	120-320 mg 114 mg 21 mg quercetina + 9 mg kaemferol 30-500 mg	Disminución presión arterial Disminución radicales libres Aumento de la actividad de superóxido dismutasa Disminución del daño oxidativo en DNA Disminución de incidencia de cáncer de pulmón y gástrico Aumento resistencia oxidación LDL	(Kudolo, 2001) (Pietri y col., 1997) (Kim y col., 2003) (Lean y col., 1999) (Garcia-Closas y col., 1999) (Chopra y col., 2000)
Alimentos derivados de soja Soja Extracto isoflavonas Proteína de soja Suplementación	Genisteina, Daidzeina Genisteina, Daidzeina Genisteina, Daidzeina Isoflavonas Isoflavonas	25-45 mg 40 mg 100 mg 90-130 mg 60-130 mg	Aumento densidad ósea Decrecimiento síntomas posmenopáusicos Disminución en LDL colesterol Menor resistencia a insulina Disminución de riesgo de cáncer de próstata	(Morabito et al., 2002) (Han y col., 2002) (Jenkins y col., 2000) (Jayagopal y col., 2002) (Knekt y col., 2002)
Té verde y negro Extractos	Catequinas Catequinas	450-1000 ml 18 mg - 375 mg	Aumento de la capacidad antioxidante plasmática Disminución de MDA en plasma Disminución de peso corporal Disminución riesgo diferentes canceres	(Young y col., 2002) (Freese y col., 1999) (Chantre & Lairon, 2002) (Arts y col., 2000)
Cacao Chocolate Vino tinto Zumo de uva, arándanos, mora Zumo de granada Extracto de pepitas de uva	Procianidinas Procianidinas Procianidinas Procianidinas Procianidinas Procianidinas	70-900 mg 320 mg 250-500 ml vino 50-500 ml zumo 1,5 mmoles 100 mg	Disminución de la presión sistólica y diastólica Disminución de oxidación de LDL Disminución peróxidos en plasma Disminución MDA, agregación plaquetaria, aumento vit C Aumento CAO plasma, resistencia oxidación LDL Disminución de circulación de anticuerpos a LDL oxidadas Disminución riesgo cáncer colon	(Taubert y col., 2003) (Nigdikar y col., 1998) (Pedersen y col., 1994) (Aviram y col., 2002) (Preuss y col., 2000)

1.2. METODOLOGÍA EXISTENTE PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EXTRAÍDOS DE ALIMENTOS.

A partir de la estructura química y la cantidad de los compuestos antioxidantes en los alimentos, se elige el proceso de extracción y de análisis adecuados y se generan bases de datos completas.

Hasta el momento no hay un único procedimiento estándar y adecuado para la extracción de todos los compuestos polifenólicos o de las diferentes clases de polifenoles. La mayor parte de estudios sobre extracción de polifenoles de matrices alimentarias están basados en la utilización de mezclas de disolventes, generalmente acuoso-orgánicos con pH ácidos para una mayor resolución en la caracterización y una mayor estabilidad de determinados compuestos, la utilización de procesos en varios pasos para optimizar el rendimiento de la extracción y en muchas ocasiones la utilización de temperaturas elevadas y tiempos largos (*Ju y Howard, 2003; Naczek y col., 1992; Cork y Krockenberger, 1991; Shahidi y col., 1991*).

Haciendo referencia a la clasificación de compuestos polifenólicos según solubilidad, esto es PE y PNE, se hará a continuación una revisión de las técnicas existentes de extracción y análisis de estos compuestos:

1. EXTRACCIÓN DE PE: En general cualquier proceso está basado en una primera extracción con disolventes acuoso-orgánicos o la mezcla de alguno de ellos (metanol, etanol, propanol, acetona, agua, dimetilformamida, acetato de etilo) obteniéndose en el extracto una mezcla de diferentes compuestos polifenólicos (*Antolovich y col., 2000*).

En la **Tabla 3** se muestran algunos ejemplos de la metodología empleada para la extracción y análisis de compuestos polifenólicos en alimentos. En general la mayor parte de estos análisis se basan en una extracción, posterior purificación y separación cromatográfica (HPLC). Existen números trabajos publicados sobre el tipo de compuestos polifenólicos extraíbles presentes en alimentos y concretamente en bebidas.

Tabla 3. Métodos de extracción y determinación de polifenoles en alimentos

Alimento	Compuestos polifenólicos	Preparación de la muestra y/o extracción	Separación	Referencia
Vino	Catequinas y proantocianidinas	Desalcoholización en rotavapor, filtración para purificar y fraccionamiento con cartuchos C18	Columna C18 (125x4 mm). A: Acetico al 2%; B: Agua: Acetonitrilo:Agua:Acetico (80:12:2)	(Fulcrand y col., 1999)
Vino tinto	Antocianidinas	Desalcoholización e inyeccion directa	Columna C18 (250x 4.6 mm). A: Agua:Ac. Formico (9:1); B: ACN: Agua: Formico (3:6:1)	(Mateus y col., 2001)
Bebidas de té	Catequinas y proantocianidinas	Extracción con acetato de etilo Extraccion con acetonitrilo-agua	Columna Bondapak C18 (300x3,9 mm). ACN:acetato de etilo: ac. Fosforico(12:2:86)	(Wang & Sporns, 1999)
Manzanas, uvas, judias	Catequinas y proantocianidinas	Extracción con 70% ó 90% metanol	Columna ODS2 (150 mmx4.6 mm). A: 5% ACN en buffer fosfato; B:25% ACN en buffer fosfato	(Arts y col., 2000)
Frutas y vegetales	Flavonas y flavonoles	Refujo con metanol 62% con HCl 1.2 M a 90°C	Nova Pak C18 (150x3.9 mm). ACN/tampón fosfato (25:75; v/v) isocratico	(Hertog y col., 1993)
Nectarinas, melocotones, ciruelas	Acidos fenólicos, catequinas, flavonoles, procianidinas	Extracción con metanol 80% conteniendo NaF 2 mM, centrifugar y filtrar	Nucleosil C18. A: 5% metanol: Agua; B: 12% metanol:agua; C: 80% metanol: agua; D: 100% metanol	(Tomás-Barberán y col., 2001)
Frambuesa roja	Acido elagico, flavonas	Extraccion con metanol, filtrado, adicion de agua, purificaion con Sep Pak C18	Lichrocart 100 RP-C18 (250x4 mm). A: 5% formico en agua; B:metanol	(Zafrilla y col., 2001)
Aceite de oliva	Acidos fenolicos, flavones, lignanos	Extraccion en cartuchos diol, lavado con hexano y acetato de etilo, resuspender en metanol	Lichrospher 100 RP-18 (250x4 mm). A: agua: acetico (97:3); B: metanol: ACN (50:50)	(Mateos y col., 2001)
Soja y alimentos de soja	Isoflavonas	Extracción con metanol 80%, centrifugación.	Novapak C18 (150x3,9 mm). Flujo isocratico ACN: agua (33:77)	(Hutabarat y col., 2001)
Cereales	Flavonoides y acidos fenólicos	Extraccion 80% etanol	Supelcosil LC-18-DB, 150x4.6 mm. Elución isocratica con ACN 20% en agua a pH 2	(Adom & Liu, 2002)

Así algunas revisiones (*Ovaskainen y col., 2008; Stan y col., 2008; Pierre y col., 2007*) demuestran que el grupo de las frutas junto al de los vegetales ocupan el primer lugar en cuanto a contenido polifenólico lo que además se relaciona con los importantes efectos en salud de estos alimentos (*Ullah y Khan, 2008; Brat y col., 2006*). Las bebidas como el té, el café, el vino, la cerveza o el aceite de oliva entre otros, por proceder de alimentos vegetales, son también una importante fuente de compuestos polifenólicos que puesto que están en forma soluble hace que estos tengan una mayor bioaccesibilidad y por tanto mayor biodisponibilidad.

La mayor parte de PE presentes en alimentos forma parte del grupo de los flavonoides (principalmente flavanoles, flavonoles, flavanonas y antiocianidinas), por ser el grupo de polifenoles presente de manera más extensa en los alimentos vegetales. El grupo de los ácidos hidroxycinámicos ha sido ampliamente estudiado por ser compuestos mayoritarios en el café y los cereales (*Herrmann, 1989*). También en los extractos de algunos alimentos (frutas, frutos secos y legumbres) se han determinados compuestos de alto peso molecular procedentes de la polimerización de flavanoles, llamadas proantocianidinas extraíbles (PAE) cuyo grado de polimerización habitualmente se encuentra entre 2 y 10 mayoritariamente. Por otro lado la condensación de algunos ácidos benzoicos (gálico o elágico) produce la formación de taninos hidrolizables extraíbles (galotaninos y elagitaninos dependiendo si proceden de la condensación de gálico o elágico respectivamente).

Sin embargo, la mayoría de los trabajos que reportan contenido de PP lo hacen siempre basándose en el análisis de los extractos acuoso-orgánicos ignorando la posible presencia de polifenoles en el residuo de dicha extracción.

2. EXTRACCIÓN DE PNE: En los residuos de las extracciones acuoso-orgánicas quedan retenidos los llamados **PNE** que incluyen generalmente polifenoles hidrolizables (PH) y proantocianidinas no extraíbles (PANE) de alto peso molecular o también llamados taninos condensados (TC). La mayoría de la información que podemos recopilar sobre el análisis de PH se basa generalmente en el análisis de los extractos acuoso-orgánicos donde es habitual la utilización de reacciones de hidrólisis básicas (*Rodriguez-Arcos y col., 2002; Hartley y col., 1991*) o ácidas (*Krygier y col.,*

1982; Matilla y col., 2000) para hidrolizar posibles enlaces éster y así liberar y cuantificar los compuestos polifenólicos presentes. Uno de los problemas que se deriva de la utilización de las hidrólisis ácidas sobre los extractos es que pueden producirse pérdidas importantes debido a una degradación de algunos polifenoles, normalmente ácidos benzoicos e hidroxycinámicos (Krygier y col., 1982). También en el caso de proantocianidinas de alto peso molecular, éstas son analizadas habitualmente en los extractos mediante separación por HPLC según grado de polimerización el cual puede ir desde dímeros hasta polímeros (Prior y Gu, 2005; Gu y col., 2002). Sin embargo, en ambos casos quedan sin cuantificar la mayor parte de PNE retenidos en el residuo de extracción, incluye PH y PANE, por lo que es probable que se esté produciendo una subestimación del contenido total de PNE (Saura-Calixto y col., 1991; Saura-Calixto & Goni, 2006).

En base a estudios previos sobre el contenido de PNE en alimentos (Saura-Calixto y col., 2007; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2005), la manera más común de extraer estos compuestos del residuo de extracción es la utilización de reacciones de hidrólisis, generalmente ácidas, aplicando elevadas temperaturas para poder liberar la mayor parte de los compuestos no extraíbles. Se cree que estos compuestos permanecen en el residuo asociados a componentes de la fibra dietética (polisacáridos) o bien formando complejos con proteínas o unidos entre sí formando compuestos de alto peso molecular. La utilización de las hidrólisis por un lado permite la liberación de los polifenoles unidos a la matriz vegetal y por otro lado permite la depolimerización de compuestos de alto peso molecular a compuestos de estructura más sencilla que puedan ser cuantificados en base a patrones conocidos, aunque es posible también que se produzca la degradación de ciertas estructuras polifenólicas. De esta manera polifenoles hidrolizables (PH) y taninos condensados o PANE son extraídos de la siguiente manera:

Polifenoles Hidrolizables (PH) son extraídos del residuo por tratamiento con metanol/H₂SO₄ (90:10, v/v) a 85°C durante 20 horas con agitación (Hartzfeld y col., 2002) obteniéndose un hidrolizado que después es usado para la cuantificación de compuestos polifenólicos.

Taninos Condensados (TC) o PANE se obtienen según método de Porter y col. (1986) por tratamiento del residuo con una solución de butanol/HCl/FeCl₃ (95:5, v/v) produciéndose el paso de proantocianidinas de alto peso molecular a unidades más sencillas en forma de cationes flavilium (solución coloreada de antocianidinas) que es posible medir espectrofotométricamente a 555 nm y calcular así la concentración

respecto de un patrón conocido. Aunque este método es el más empleado para la extracción de PANE, recientemente se han descrito otras técnicas basadas en la tioacidólisis de *Guyot y col. (2001)* con algunas modificaciones. Así, una alícuota del residuo liofilizado (10-20 µg) obtenido tras la extracción acuoso-orgánica se diluye en una solución al 5% de bencilmercaptano en metanol conteniendo 1.1% HCl. Después se incuba a 40°C durante 30 min, se enfría y se mide en HPLC (*Hellström y Mattila, 2008*).

3. CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PP: La importancia del análisis de los compuestos polifenólicos en los alimentos radica, no sólo, en encontrar el mejor método de extracción si no también en la cuantificación e identificación completa y precisa de estos compuestos. Para ello existen numerosos métodos espectrofotométricos basados en diferentes principios químicos por los que se pueden cuantificar desde polifenoles totales hasta determinados grupos de compuestos. Entre estos métodos se encuentran el método de Folin-Ciocalteu para la cuantificación de polifenoles totales (*Singleton y col., 1998*) o el método de la vainillina para determinación de proantocianidinas (*Okuda y col., 1989*) entre otros.

Sin embargo, a pesar de los intentos por desarrollar métodos sencillos de cuantificación en UV-VIS, la absorción de los compuestos polifenólicos se ve afectada por la naturaleza de los disolventes, el pH de los extractos y por otros compuestos que absorben en UV-VIS y que actúan como interferencias (grasas, vitaminas, amino ácidos) (*Georgé y col., 2005*). De esta manera en los últimos años la mayoría de los trabajos sobre análisis de polifenoles se basan en la utilización de métodos cromatográficos, cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), cromatografía de gases (CG) o electroforesis capilar (EC) acoplados muchas veces a espectrometría de masas (MS). La CG requiere que los compuestos sean volátiles para lo cual si estos no lo son se utilizan reacciones de derivatización (reacciones químicas). Las técnicas de HPLC son las más habituales para separar y cuantificar polifenoles. Existe una amplia variedad de soportes y fases móviles disponibles para la determinación de flavonoides, proantocianidinas, ácidos benzoicos, etc como ya se ha descrito anteriormente. Para la separación y detección, las columnas más utilizadas son las de fase reversa (C18 habitualmente) y fase normal (sílice) y los detectores más habituales son UV-VIS diodo

array (DAD) y UV-fluorescencia entre otros (*Cabrera y col., 2003; Mateus y col., 2001; Arts y col., 2000; Wang y col., 2000*). La separación por HPLC muchas veces va acoplada con una caracterización estructural para lo cual es necesaria la espectrometría de Masas que puede ser de varios tipos según la fuente de ionización que utilice. Encontramos, espectrometría de masas con ionizador por electro spray (ESI-MS) (*Tomás-Barberán y col., 2001; Peng y col., 2001; Barnes, y col., 1998*), la espectrometría de Masas por bombardeo con átomos rápidos (FABMS) (*Edenharder y col., 2001; Sano y col., 1999*), espectrometría con ionización/desorción por laser (MALDI-MS) (*Wang y Sporns, 1999*) y MALDI acoplado en línea con un espectrofotómetro de tiempo de vuelo (TOF) (*Menet y col., 2004*).

Toda ésta metodología es habitualmente utilizada para la cuantificación de compuestos polifenólicos presentes en extractos acuoso-orgánicos de alimentos sólidos o bebidas. Sin embargo, la cuantificación de taninos condensados o proantocianidinas de alto peso molecular y polifenoles hidrolizables, principales compuestos polifenólicos presentes en los residuos de extracción, se ha basado hasta ahora en la utilización de métodos espectrofotométricos. Así, los polifenoles hidrolizables extraídos por metanólisis son cuantificados por Folin-Ciocalteu a 750 nm frente a curvas de calibrado de ácido galico, cafeico o algún ácido benzoico similar dependiendo de la muestra (*Hartzfeld y col., 2002*) y las proantocianidinas de alto peso molecular son depolimerizadas por hidrólisis con butanol/HCl transformándose en cationes flavilium dando una solución coloreada (roja) que puede medirse a 554 nm frente a estándares de flavanoles o antocianidinas conocidos (*Porter y col., 1986*).

La no existencia de patrones de taninos hace que la cuantificación se tenga que realizar mediante la transformación de estos polímeros a unidades más sencillas.

Actualmente emerge la necesidad de conocer las estructuras de dichos compuestos no extraíbles para correlacionar las cantidades tan importantes presentes en algunos alimentos con los posibles efectos biológicos que algunos autores ya han reportado (*Serrano y col., 2009; Knasmuller y col., 2009; Larrosa y col., 2006*). Sin embargo, hasta el momento no se han descrito métodos de análisis por HPLC centrados en la identificación de estos compuestos. Algunos autores empiezan a tomar en cuenta estos compuestos los cuales cuantifican e identifican, tras una depolimerización ácida y

posterior tiólisis en el residuo, estructuras correspondientes a flavan-3-oles y benciltioeteres analizadas por HPLC-ESI/MS (*Hellström y Mattila, 2008*).

1.3. CONTRIBUCIÓN DE LA TESIS A LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN LA DIETA.

Resumiendo lo que hasta este punto se ha expuesto, existen numerosos procesos de extracción para obtener los compuestos polifenólicos presentes en un alimento para posteriormente poder cuantificarlos e identificar sus estructuras mediante técnicas más complejas. Hasta el día de hoy los numerosos trabajos que reportan contenido de polifenoles en alimentos se centran en algunos alimentos vegetales o en un cierto grupo de compuestos polifenolicos (habitualmente flavonoides). De esta manera pueden encontrarse en bibliografía varias bases de datos (*USDA, 2007, 2004; Phenol-Explorer; EuroFIR*) sobre contenido de polifenoles en alimentos; sin embargo, la mayor parte de estas bases de datos se refieren al análisis de polifenoles en extractos acuoso-orgánicos ignorando los compuestos polifenólicos que permanecen en el residuo de la extracción. En base a esta primera apreciación, puede deducirse que los datos reportados en bibliografía parecen estar incompletos.

Por otro lado, encontramos que los datos que hasta el momento existen publicados sobre la determinación de compuestos polifenolicos no extraíbles están basados en la utilización de métodos espectrofotométricos y que además no existe información más precisa relativa al tipo de estructuras que poseen estos compuestos no extraíbles. En base a esta falta de información, el trabajo expuesto en esta memoria pretende esclarecer tanto el tipo de compuestos polifenolicos presente en alimentos de tipo vegetal como el contenido que en ellos existe.

Dada la importancia que tiene el conocimiento completo del contenido de polifenoles en los alimentos que se consumen en una dieta, esta Tesis intentará avanzar un paso más en la obtención de una estimación completa de la ingesta diaria de polifenoles, tanto extraíbles como no extraíbles. Existen trabajos previos del grupo de investigación dentro del cual está comprendida esta Tesis en los que se estudia la capacidad antioxidante de todos los grupos de alimentos vegetales y bebidas consumidos en la

dieta Española (*Saura-Calixto y col., 2007*) haciéndose una primera estimación del contenido total de polifenoles por métodos espectrofotométricos. En esta Tesis se completa la información sobre el contenido de polifenoles en la dieta española utilizando técnicas de HPLC-MS, aportando por primera vez datos específicos de composición e ingesta de polifenoles individuales e identificación de los principales tipos de compuestos.

Los resultados que se recopilan en este trabajo han sido expuestos en función del tipo de alimentos, teniendo en cuenta las diferentes técnicas aplicadas y la problemática surgida en la determinación de los distintos compuestos polifenólicos. Por esta razón se reúnen en un primer bloque la determinación de compuestos polifenólicos procedentes del grupo de las frutas y los cereales. A continuación se presenta un segundo bloque que detalla la metodología para la determinación de capacidad antioxidante y polifenoles en frutos secos, que por ser alimentos con alto contenido en grasa presentan mayor complejidad en la determinación de estos compuestos. Y por último en un tercer bloque se reúnen todos los datos sobre el contenido e ingesta de compuestos polifenólicos, extraíbles y no extraíbles, de los grupos de alimentos vegetales con mayor contribución en la dieta española (frutas, vegetales, cereales, frutos secos y legumbres).

2. OBJETIVOS

De los antecedentes anteriormente desarrollados en la introducción de este trabajo, se deriva la **hipótesis** de que la cantidad de compuestos polifenólicos no extraíbles de alimentos vegetales, generalmente ignorados en la literatura, pueden encontrarse en una proporción mayor que los polifenoles extraíbles. Para desarrollar esta Tesis se fijaron un objetivo general y varios objetivos específicos:

OBJETIVO GENERAL: Cuantificación e identificación estructural de los compuestos polifenólicos extraíbles y no extraíbles procedentes de la ingesta de los diferentes grupos de alimentos vegetales de la dieta española.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Desarrollo de técnicas cromatográficas de alta eficacia (HPLC-MS) en la determinación de compuestos polifenólicos no extraíbles de alimentos vegetales.
- Determinación del contenido de proantocianidinas de alto peso molecular no consideradas habitualmente en alimentos vegetales.
- Determinación de compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante en alimentos vegetales ricos en grasa (frutos secos).
- Estimación completa de la ingesta de polifenoles en la dieta española.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA PARA LA EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EXTRAÍBLES Y NO EXTRAÍBLES EN FRUTAS Y CEREALES.

I. 1. Introducción:

En esta tesis los resultados obtenidos han sido divididos en tres bloques cada uno de los cuales contiene un número determinado de artículos científicos (capítulos) en función del tipo de muestras analizadas y la metodología aplicada.

La clasificación de polifenoles según solubilidad divide a los mismos en extraíbles y no extraíbles como ya se ha indicado. Esta clasificación puede ayudar a entender el comportamiento fisiológico de los polifenoles en el tracto intestinal donde estos compuestos pueden ser, total o parcialmente absorbidos y metabolizados. La mayor parte de PE son disueltos y por tanto estarán biodisponibles en los fluidos intestinales para atravesar la barrera intestinal (mucosa) y después ser metabolizados para posteriormente ejercer efectos sistémicos a diferentes niveles.

Por el contrario, los PNE son transportados por el tracto gastrointestinal asociados a la matriz alimentaria insoluble (polisacáridos indigestibles de la pared celular) y llegan al colon, inalterados. Allí es donde pueden ser metabolizados por la microbiota colónica pasando a ser metabolitos absorbibles (ácido fenilacético, ácido fenilpropiónico, urolitina, etc) o no absorbibles los cuales permanecerán en el lumen colónico donde contribuirán al efecto antioxidante y protector frente a sustancias pro-oxidantes (*Saura-Calixto y col., en prensa; Cerdá y col., 2005*).

Numerosos artículos a lo largo de varias décadas han centrado su estudio en la elucidación de la estructura y la cantidad de compuestos extraíbles correlacionando esto con la metabolización de los mismos y los efectos beneficiosos que se derivan de la ingesta de alimentos que los contienen. Sin embargo, la mayor parte de los estudios, como ya se ha mencionado, se centran o bien en algunos grupos de polifenoles (mayoritariamente flavonoides) o bien en alimentos concretos, ignorando aquellos compuestos que por no ser extraídos quedan en el residuo de las extracciones acuoso-orgánicas.

Se eligieron las frutas y los cereales para este bloque de resultados. Las frutas representan uno de los alimentos vegetales más consumido en la dieta y que poseen la más amplia diversidad de polifenoles, incluyendo extraíbles y no extraíbles. Los cereales son el grupo de alimentos vegetales de mayor consumo en la mayor parte de las dietas y son además una fuente importante de fibra, la cual generalmente contiene cantidades significativas de PNE asociados.

Para abarcar los objetivos propuestos, se analizaron inicialmente algunas frutas y cereales de manera individual para aplicar la metodología seleccionada al análisis completo de PE y PNE. Después de una revisión de la metodología existente para la determinación de polifenoles, numerosa y detallada para PE y muy escasa y limitada para PNE, en este primer bloque se presentan los métodos seleccionados para la óptima determinación tanto de PE como de PNE presentes en frutas y cereales que posteriormente será extendido a otros grupos de alimentos consumidos en la dieta.

I. 2. ARTÍCULO 1:

HIGH CONTENTS OF NON-EXTRACTABLE POLYPHENOLS IN FRUITS SUGGEST THAT POLYPHENOL CONTENTS OF PLANT FOODS HAVE BEEN UNDERESTIMATED.

Resumen: Generalmente en la bibliografía, el contenido de polifenoles en frutas se refiere a polifenoles extraíbles (PE) analizados en mezclas de disolventes acuoso-orgánicos. Sin embargo, existe una cantidad significativa de compuestos bioactivos, llamados polifenoles no extraíbles (PNE), que normalmente no se tienen en cuenta en los análisis nutricionales. Por ello el principal objetivo de este trabajo fue el análisis de PE y PNE (polifenoles hidrolizables y proantocianidinas).

Los PE fueron analizados en los extractos metanol/acetona mientras que los PNE se determinaron en los hidrolizados ácidos obtenidos de la hidrólisis de los residuos de la extracción de manzana, melocotón y nectarina. Para ello se utilizaron técnicas de HPLC-MS y espectrofotometría.

Los resultados muestran que el contenido de PNE (112-126 mg/100 g fruta fresca) fue mayor que el contenido de PE (18.8-2.8 mg/100 g fruta fresca). Serían necesarios posteriores análisis de proantocianidinas no extraíbles (PANE) y polifenoles hidrolizables (PH) en otras frutas y alimentos vegetales consumidos en dietas para obtener una base de datos completa y útil para estudios nutricionales y biológicos.

I.3. CAPITULO 2:

PROANTHOCYANIDIN CONTENT IN FOODS IS LARGELY UNDERESTIMATED IN THE LITERATURE DATA. AN APPROACH TO QUANTIFICATION OF THE MISSING PROANTHOCYANIDINS.

Resumen: El contenido de proantocianidinas (PA) en alimentos es generalmente determinado mediante HPLC en extractos acuoso-orgánicos. Sin embargo, existe una fracción de PA en el residuo de esas extracciones, llamadas proantocianidinas no extraíbles (PANE), que habitualmente no es tenido en cuenta en los análisis. Se han llevado a cabo varios ensayos para determinar las PANE mediante la utilización reacciones enzimáticas y químicas obteniéndose resultados parciales.

El principal objetivo planteado en este trabajo fue la estimación del contenido total de PA, incluyendo PA extraíbles (PAE) y PANE en algunos alimentos incluidos en la base de datos de la USDA. Un procedimiento específico basado en la depolimerización con Butanol/HCl fue utilizado para cuantificar PANE en los residuos. El contenido de PANE en las muestras analizadas varió desde 11 mg/100 g peso seco en el caso de la pera a 6,7 g/100 g peso seco en hollejos de uva roja.

Los resultados muestran que los datos publicados en la literatura sobre contenido de PA en alimentos subestiman el contenido real. Las PANE pueden tener una contribución significativa sobre los efectos en salud asociados a alimentos y dietas ricas en PA.

I. 4. CAPITULO 3:

ANALYSIS OF POLYPHENOLS IN CEREALS MAY BE IMPROVED PERFORMING ACIDIC HYDROLYSIS: A STUDY IN WHEAT FLOUR AND WHEAT BRAN AND CEREALS OF THE DIET.

Resumen: La mayor parte de trabajos científicos basados en la determinación de compuestos polifenólicos en cereales se refieren a compuestos determinados en extractos acuoso-orgánicos y en hidrolizados básicos. Sin embargo, en el residuo de extracción quedan retenidas apreciables cantidades de compuestos polifenólicos unidos posiblemente a otros compuestos de la matriz celular.

El principal objetivo de este trabajo fue comprobar si la hidrólisis con ácido sulfúrico podía liberar un mayor número de compuestos polifenólicos comparado con la hidrólisis básica que hasta el momento se reporta en la literatura, para posteriormente ser considerado en los estudios analíticos y nutricionales. Se llevó a cabo, mediante la técnica de HPLC acoplada a MS, la cuantificación e identificación de polifenoles en los extractos acuoso-orgánicos y en los hidrolizados básicos y ácidos del residuo de extracción de dos muestras por separado (harina y salvado de trigo) y en una mezcla de alimentos representativa de la ingesta per cápita y día de cereales en la dieta española.

Los resultados mostraron que la cantidad de polifenoles en los hidrolizados ácidos (200-1600 mg/100 g en harina y salvado respectivamente) fue mayor que en los hidrolizados básicos (0.2- 372 mg 100 g en harina y salvado respectivamente). Además, las cantidades de compuestos polifenólicos en los extractos acuoso-orgánicos fue menor que en los hidrolizados (44-160 mg/100 g en harina y salvado).

Los principales compuestos polifenólicos identificados en los hidrolizados ácidos fueron el ácido hidroxibenzoico, el cafeico, el ferúlico y el ácido protocatéquico.

Tras aplicar la misma metodología a los cereales de la dieta española, la ingesta de compuestos polifenólicos fue estimada en 360 mg/persona/día, de los cuales 65 mg eran compuestos extraíbles y 295 no extraíbles.

Puede concluirse que la hidrólisis ácida, generalmente omitida en el análisis de polifenoles en cereales, puede permitir la liberación de una mayor cantidad de compuestos polifenólicos y así obtener valores más próximos a los contenidos reales.

I. 5. Conclusiones:

- La determinación completa de los compuestos polifenólicos en frutas requiere, además de la determinación habitual de PE en extractos acuoso-orgánicos, análisis específicos de PNE determinados en los hidrolizados del residuo obtenido tras la extracción acuoso-orgánica.
- La cuantificación de polifenoles totales en algunas frutas muestra que las cantidades de PNE encontradas (112-126 mg/100 g peso seco) pueden ser mayores que las concentraciones de PE (18-28 mg/100 g peso seco). Es necesaria la realización de más ensayos en otras frutas y otros grupos de alimentos consumidos en la dieta para comprobar este hecho y disponer de una base de datos más completa.
- El grupo de las proantocianidinas, derivados poliméricos de los flavanoles, está presente de manera habitual en muchas frutas. La cuantificación de PA requiere el análisis de PAE, generalmente mediante HPLC en fase normal cuya separación se realiza según grado de polimerización y de PANE las cuales requieren tratamientos químicos para poder ser liberadas del residuo. Los resultados muestran que en general el contenido de PANE (32 a 6700 mg/100 g peso seco), es significativamente mayor que el de PAE (14-1686 mg/100 g peso seco).
- Los ensayos para cuantificar e identificar PANE a través de hidrólisis enzimáticas o tiólisis del residuo y posterior análisis por HPLC, aunque dan información sobre el tipo de compuestos presentes en el residuo (derivados poliméricos de flavan-3-oles), obtienen resultados cuantitativos mucho menores que los obtenidos por depolimerización con butanol/HCl.
- Se ha optimizado un método químico para estimar el contenido de PANE basado en la depolimerización de PA mediante hidrólisis ácida con butanol/HCl/FeCl₃ a 100 °C durante 60 minutos obteniéndose una solución de antocianidinas medidas a 555 nm y cuantificadas en base a un patrón de concentrado de PA, testado como el más adecuado para estos análisis.
- La hidrólisis ácida con metanol/H₂SO₄ sobre el residuo de la extracción acuoso-orgánica, generalmente no utilizada para el análisis de PP en cereales, produce la liberación de una mayor cantidad de PH comparado con la hidrólisis básica (NaOH 2M) que habitualmente es utilizada en bibliografía.

- Los PH en harina y salvado de trigo obtenidos por hidrólisis ácida (200-1600 mg/100g peso seco) son mayores que los obtenidos por hidrólisis básica (0.2-372 mg/100 g peso seco) representando hasta 5 veces más la cantidad de PE (44-160 mg/100 g peso seco).
- Los resultados para la mezcla de cereales, representación de los consumidos en la dieta española (140 g/persona/día), muestran resultados similares para el contenido de polifenoles, estimándose una ingesta total de polifenoles de 360 mg/persona/día, incluyendo 65 mg/día de PE y 295 mg/día de PH.
- Tras los resultados obtenidos en frutas y cereales, es necesario la optimización de los procedimientos analíticos, especialmente sobre las posibles degradaciones de polifenoles con las hidrólisis acidas.
- La actividad biológica de los PNE puede implicar importantes efectos en salud ya que estos pueden llegar a colon donde serán fermentados por la microflora colónica produciendo metabolitos biodisponibles o incrementando el estatus antioxidante del intestino.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**II. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS Y
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN FRUTOS SECOS Y ACEITES
CONSUMIDOS EN LA DIETA ESPAÑOLA.**

II. 1. Introducción:

En una dieta es fundamental controlar el aporte de grasa y la calidad de la misma ya que existe una estrecha relación de la ingesta de grasa y el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. En las últimas décadas existe evidencia de que los aceites vegetales, entre ellos el aceite de oliva, y los frutos secos, consumidos de manera habitual en la dieta mediterránea ejercen un papel protector frente a ese tipo de enfermedades siendo, la capacidad antioxidante (CAO) que exhiben los polifenoles y tocoferoles y el contenido de ácidos grasos monoinsaturados presentes en este tipo de alimentos, los factores principales de prevención de enfermedades crónicas.

El consumo de los aceites vegetales en la dieta española se estima en unos 56 g/día siendo el aceite de oliva el más consumido (53% del total de aceites vegetales) y el que mayores propiedades saludables posee tales como prevención de cáncer de colon y pulmón, efectos preventivos en enfermedad cardiovascular especialmente por disminuir la presión sanguínea y las LDL, actividad antimicrobiana del hidroxitirosol, tirosol y oleuropeína en infecciones intestinales y respiratorias (*Farah y col., 2008; Harris y col., 2008; Waterman y Lockwood, 2007; Lairon, 2007*).

Por otro lado a pesar de que el consumo de frutos secos es muy diferente según zonas, son muchos los estudios epidemiológicos y clínicos que relacionan un consumo frecuente de frutos secos con una menor incidencia de enfermedad cardiovascular (*Simopoulos, 2001; Kris-Etherton y col., 2001 ; Kris-Etherton y col., 1999; Hu y col., 1998*). Por ésta razón la dieta Mediterránea es un ejemplo de dieta saludable en la que se incorporan al consumo diario 7 g de frutos secos de los cuales un 12% son almendras, 16% cacahuetes, 16% nueces y un 56% de otros (donde se incluyen frutas y vegetales deshidratados y otros frutos secos como pistacho y avellanas).



Figura 4. Rueda de alimentos antioxidantes

Los efectos en salud citados están relacionados con la composición de los frutos secos y más concretamente con el contenido de una serie de sustancias significativas para la nutrición humana. Cabe destacar, principalmente, el alto contenido en lípidos, que se encuentran en cantidades variables desde 43-77% , de los cuales más de un 75 % son ácidos grasos mono y poliinsaturados, de gran importancia éstos últimos por mostrar efectos cardioprotectores (*Kris-Etherton y col., 2001; Fraser, 1999*). Además contienen proteínas (7.5-21.5%), azúcares solubles totales (0.55-3.96%), minerales (1.1-3.2%) y compuestos antioxidantes como vitaminas (especialmente las E, A, B1 y B2) y polifenoles (*King y col., 2008; Padilla y col., 2008; Kornsteiner, 2006; Kris-Etherton, Zhao y col., 2001*) además de otros compuestos fitoquímicos como los esteroides.

La mayor parte de alimentos y bebidas que presentan una alta CAO poseen un bajo contenido en grasa (frutas y vegetales). Sin embargo, los frutos secos que poseen ese alto contenido en grasa, al mismo tiempo muestran una alta CAO. Recientes estudios determinan, mediante diferentes metodologías, la CAO que presentan frutos secos como almendras, nueces de brasil, avellanas, nueces de macadamia, cacahuets, pistachos y piñones entre otros (*Padilla y col., 2008; Pellegrini y col., 2006; Wu y col., 2004*).

Debido a que no existe un estudio más detallado del tipo de compuestos responsables de la alta CAO que presentan estos alimentos y de la distribución de los mismos en los frutos secos, en este bloque 2 se muestran los resultados relacionados con un primer objetivo que fue el análisis de la contribución relativa a la CAO de las dos fracciones de un fruto seco, parte desgrasada y aceite, que hasta el momento no se había estudiado. Además se verá el posible efecto de interferencia que el aceite muestra en la determinación de la CAO. Como segundo objetivo se estudió la composición y la CAO de aceites de diferentes frutos secos correlacionándolo con la estabilidad oxidativa de los mismos.

Para el primer objetivo se eligió la nuez por ser el fruto seco con mayor CAO y mayor contenido en aceite y compuestos antioxidantes y para el estudio de la estabilidad oxidativa se seleccionaron además otros frutos secos (avellana, almendra, cacahuete y pistacho) y los resultados se compararon con aceite de oliva virgen extra.

II. 2. CAPITULO 4:

ANTIOXIDANT CAPACITY OF WALNUT (*JUGLANS REGIA L.*): CONTRIBUTION OF OIL AND DEFATTED MATTER

Resumen: Numerosos estudios concluyen que la nuez (*Juglans regia L.*) es el fruto seco que mayor CAO presenta. Sin embargo, la contribución a la CAO de las dos fracciones del fruto (parte desgrasada y aceite) es desconocida, por lo que ese fue el principal objetivo de este estudio. La CAO fue evaluada en el aceite, en la parte desgrasada y en la nuez entera. Los compuestos polifenólicos fueron analizados en la nuez entera y en la desgrasada.

Los resultados mostraron que la parte desgrasada proporcionaba la mayor parte de la CAO (estimada alrededor de 332 $\mu\text{mol Trolox/g}$ peso seco) de este fruto, donde la mayor contribución procedía de los polifenoles hidrolizables insolubles en el residuo de extracción. La contribución del aceite de nuez a la CAO total (calculada con FRAP y ABTS) es inferior al 5%. Además se observó que el aceite ejercía un efecto de interferencia en la medida de la CAO en la nuez entera, un hecho que puede afectar a los datos publicados hasta el momento sobre CAO en frutos secos. Por este motivo se propone el análisis por separado del aceite y fracción desgrasada en la medida de CAO y de compuestos polifenólicos.

II. 3. CAPITULO 5:**COMPARISON BETWEEN FREE RADICAL SCAVENGING CAPACITY AND OXIDATIVE STABILITY OF NUT OILS**

Resumen: Diversos trabajos han estudiado la capacidad de los aceites de frutos secos de capturar radicales libres. Sin embargo, estos estudios no consideran parámetros cinéticos en la medida de la CAO, lo cual fue uno de los principales objetivos de este trabajo. También se estudió la posible relación entre la CAO (medida por DPPH) y la estabilidad oxidativa (medida por el método Rancimat) de diferentes aceites de frutos secos (avellana, almendra, cacahuete, pistacho y nuez).

El orden en el que aumenta la CAO y la estabilidad oxidativa en estos aceites es: pistacho > avellana > nuez > almendra > cacahuete. Se encontró una correlación significativa entre los valores proporcionados por el método DPPH y aquellos obtenidos por Rancimat. Los tocoferoles parecen ser los compuestos principalmente responsables de la CAO de los aceites, siendo despreciable la contribución de los compuestos polifenólicos. Se observó también un posible efecto de interferencia de los fosfolípidos presentes en la fracción polar de los aceites en la determinación de polifenoles, tanto en los ensayos de Folin-Ciocalteu como en el de *orto*-difenoles.

II. 4. Conclusiones:

- La contribución del aceite de los frutos secos al total de la capacidad antioxidante de los mismos es inferior al 5%.
- La fracción polar del aceite de los frutos secos presenta mayor CAO que la apolar e incluso mayor que el propio aceite. Esto puede deberse a que los compuestos lipofílicos son más activos en un medio polar (paradoja polar).
- La fracción desgrasada contiene la mayor proporción de compuestos antioxidantes, principalmente en forma de polifenoles hidrolizables que no son extraídos con disolventes acuoso-orgánicos.
- Es recomendable para la determinación de capacidad antioxidante en frutos secos la medida por separado en el aceite y en la fracción desgrasada para evitar interferencias.
- Existe una correlación significativa entre la capacidad antioxidante medida por DPPH y la estabilidad oxidativa determinada por el método de Rancimat, en todos los aceites testados de frutos secos. Esto indica o confirma que los aceites que presentan mayor estabilidad a la oxidación son los de mayor CAO.
- Los tocoferoles son los principales compuestos responsables de la capacidad antioxidante en los aceites.
- Se ha encontrado una cierta contribución de los fosfolípidos a la CAO y por tanto a la estabilidad oxidativa de los aceites de frutos secos medida por los métodos DPPH y Rancimat respectivamente.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III : INGESTA DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN LA DIETA ESPAÑOLA

III. 1. Introducción:

Existe evidencia científica de que una dieta adecuada es un factor fundamental en la prevención de las enfermedades crónicas más comunes en nuestra sociedad (enfermedades cardiovasculares (ECV), diabetes, cáncer y enfermedades neurodegenerativas). Por ello, actualmente la nutrición debe tener en cuenta, además de la energía y nutrientes de la dieta, numerosos compuestos bioactivos que se consideran esenciales en salud. Son constituyentes que se encuentran en cantidades muy pequeñas en los alimentos pero que tienen una elevada actividad biológica. Los principales compuestos bioactivos de los alimentos son polifenoles, carotenoides y fitoesteroles.

Recientes estudios de investigación prospectivos han concluido la relación de la dieta tipo Mediterránea con una menor presión arterial (*Psaltopoulou y col., 2004*), una reducción en el riesgo de ECV (*Vincent-Baudry y col., 2005*) y de la mortalidad total por ECV y por ciertos tipos de cáncer (*Cottet y col., 2005; Trichopoulou y col., 2003*).

Saura-Calixto y Goñi (2009) recogen recientemente en una revisión general, la definición de Dieta Mediterránea basada en compuestos bioactivos. De este modo la Dieta Mediterránea se caracteriza por:

- Alta relación lípidos monoinsaturados/lípidos saturados (derivado del alto consumo de aceites de oliva)
- Consumo moderado de etanol (principalmente en forma de vino)
- Alto consumo de legumbres, cereales (principalmente sin refinar y en forma de pan), frutas y vegetales.
- Bajo consumo de carne y productos cárnicos.
- Moderado consumo de leche y derivados lácteos.
- Alto consumo de pescado y productos derivados.

La dieta española, como ejemplo de dieta Mediterránea se acercaría al patrón de dieta saludable. Los principales alimentos vegetales que aportan antioxidantes a la dieta son los que se representan en la **Figura 5**. Habría que incluir en esta tabla la aportación de otras bebidas como el café, vino, cerveza y té que son una fuente importante de antioxidantes altamente biodisponibles (*Saura-Calixto y Goñi, 2006*).



Figura 5. Principales alimentos que

contribuyen a la capacidad antioxidante de la dieta.

La bibliografía ofrece datos dispersos sobre el contenido de compuestos bioactivos de alimentos aislados y prácticamente son inexistentes las estimaciones realizadas en dietas completas (Ovaskainen y col., 2008; Saura-Calixto y col., 2007; Scalbert, 2005) por lo que apenas se dispone de datos sobre ingestas poblacionales de dichos compuestos. Centrándonos en la dieta Española, se han realizado algunas estimaciones de ingesta de compuestos polifenólicos (1209 mg/persona/día) (Saura-Calixto y col., 2007; Saura-Calixto & Goni, 2006), fitoesteroles (348 mg/persona/día) (Jiménez-Escrig y col., 2006) y carotenoides (4 mg/persona/día) (Granado y col., 1996).

En base a los datos del consumo de alimentos publicado por el MAPA (*Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*, 2006), la cantidad consumida per cápita y día de porción comestible de frutas, verduras, cereales, frutos secos y legumbres se utilizó para preparar 5 muestras que representan el total de todos los alimentos vegetales consumidos en la dieta. La extracción de los compuestos polifenólicos objeto de estudio se llevaron a cabo en cada una de las 5 muestras liofilizadas y molidas. En base a los resultados cuantitativos del número de polifenoles y a los datos de consumo, se determinó la ingesta de compuestos polifenólicos en la dieta española y la contribución la misma de cada uno de los grupos de alimentos.

III. 2. CAPITULO 6:

NON EXTRACTABLE POLYPHENOLS, USUALLY IGNORED, ARE THE MAJOR PART OF DIETARY POLYPHENOLS. A STUDY ON THE SPANISH DIET

Resumen: Los compuestos polifenólicos que se ingieren con la dieta pueden dividirse en dos grupos: polifenoles extraíbles (PE) o compuestos solubles en disolventes acuoso-orgánicos y polifenoles no extraíbles (PNE) o compuestos que permanecen en el residuo de extracción. La mayoría de los estudios que se ocupan del análisis de polifenoles en alimentos y de la ingesta de los mismos, únicamente publican datos de PE.

El objetivo de este último trabajo fue la determinación de los valores reales de polifenoles, incluyendo PE y PNE, en alimentos y concretamente en una dieta completa. Los análisis fueron llevados a cabo mediante el uso de HPLC-MS para la identificación de PE en los extractos acuoso-orgánicos y de PNE en hidrolizados ácidos de los correspondientes residuos obtenidos de cinco muestras que representaban a los 5 grupos de alimentos vegetales de la dieta (frutas, vegetales, cereales, frutos secos y legumbres).

El contenido de PNE, estimado como la suma de polifenoles hidrolizables (PH) más proantocianidinas no extraíbles (PANE), variaba entre 880 mg/100 g peso seco en frutas a 210 mg/100 g peso seco en cereales y el contenido es sustancialmente mayor que el de PE. El consumo de PNE en la dieta española (942 mg/persona/día) es mayor que el de PE (258 mg/persona/día) donde frutas y vegetales (746 mg/día) son los grupos de alimentos con mayor contribución al total de la ingesta de polifenoles (1201 mg/día).

Se concluye por tanto que los PNE representan la mayor parte de los polifenoles de la dieta. Sin embargo, es necesario un conocimiento más amplio de las propiedades fisiológicas de los PNE las cuales pueden ayudar a entender el potencial efecto en salud de los polifenoles ingeridos en la dieta.

III. 3. Conclusiones:

- La cantidad de compuestos polifenólicos no extraíbles (PNE) en alimentos vegetales es sustancialmente mayor que la cantidad de polifenoles extraíbles (PE).
- La ingesta diaria de polifenoles en la dieta española., incluyendo PE y PNE, derivada de alimentos vegetales ha sido estimada alrededor de 1200 mg/día /persona.
- Los PNE, incluyendo polifenoles hidrolizables (PH) y proantocianidinas no extraíbles (PANE), representan la mayor parte de polifenoles en la dieta.
- Los principales PE identificados en la dieta española han sido flavonoles, flavan-3-oles, flavanones y antocianidinas y entre los PNE los principales fueron los ácidos benzoicos, hidroxicinámicos y monómeros y polímeros de proantocianidinas.
- Las frutas y los vegetales proporcionaron la mayor proporción de PNE en la dieta (sobre un 60% de la dieta) seguido de cereales.
- Los PNE son compuestos bioactivos que contribuyen al aumentos del estatus antioxidante en el intestino humano y que son degradados por la microflora colónica produciéndose metabolitos biodisponibles (urolitina, ácido fenilacético, ácido fenilpropiónico).
- Son necesarios un mayor número de estudios para la determinación de las concentraciones, composición y propiedades fisiológicas de los PNE en alimentos específicos y en dietas para aumentar el conocimiento sobre el potencial efecto de los polifenoles en salud.

4. DISCUSIÓN GENERAL

La elaboración final de la Memoria de esta Tesis Doctoral permite disponer de una visión global del trabajo desarrollado. La perspectiva que siempre proporciona el paso del tiempo, competencia que se adquiere durante el periodo de formación doctoral, permite realizar una discusión de los resultados de manera crítica y realizar una autoevaluación científica de la memoria que se presenta.

En primer lugar hay que destacar la importancia que tienen los compuestos polifenólicos no extraíbles, que como se ha justificado con los resultados, suponen la fracción más importante del total de los polifenoles en la mayor parte de alimentos de la dieta, siendo las frutas, las legumbres y los frutos secos las principales fuentes de PNE, incluyendo PANE y PH. Estos resultados suponen un mayor conocimiento de la composición de alimentos consumidos en la dieta como complemento a la amplia información que ya existe sobre PE y que pueden ayudar a entender su biodisponibilidad y las propiedades fisiológicas y por tanto los efectos en salud que poseen.

Es importante destacar que aunque la determinación de PE ha sido un objetivo secundario en el desarrollo de esta tesis, ha sido necesario y de gran utilidad la aplicación de métodos ya existentes de HPLC-MS que nos ha proporcionado la identificación y cuantificación, por primera vez, de la mayor parte de estos compuestos en todos los grupos de alimentos de la dieta española.

En relación a los PE es necesario advertir que para su extracción se ha llevado a cabo un determinado procedimiento de extracción empleando metanol/acetona que fue optimizado en su momento y ha sido utilizado para diferentes tipos de muestras (*Pérez-Jiménez y Saura-Calixto, 2005; Jiménez-Escrig y col., 2003*) consiguiendo un rendimiento máximo para extraer la mayor variedad de compuestos polifenólicos. No obstante existen numerosos protocolos de extracción que pueden proporcionar mayores rendimientos de extracción en algún tipo determinado de polifenoles.

El mayor reto propuesto durante la realización de esta tesis fue la búsqueda de metodología basada en HPLC para de identificación y cuantificación de los PNE que hasta el momento sólo han sido cuantificados parcialmente en algunos alimentos, por métodos espectrofotométricos. En este sentido se ha conseguido la identificación de los principales compuestos polifenólicos no extraíbles mediante el sometimiento del residuo de extracción a dos tratamientos diferentes:

- La hidrólisis ácida con metanol/H₂SO₄ produce la liberación de la mayor parte de polifenoles hidrolizables que se encuentran atrapados o unidos en la matriz vegetal. Se ha demostrado que esta hidrólisis proporciona mejores rendimientos que la hidrólisis básica, utilizada principalmente para cereales. Es necesario destacar que el objetivo era la liberación de los polifenoles presentes en el residuo y no la ruptura de enlaces éster que es para lo que la mayoría de autores utilizan la hidrólisis en cereales sobre el extracto y no sobre el residuo. Ciertos ácidos hidroxycinámicos presentes en el residuo pueden estar siendo degradados con la hidrólisis ácida como se ha descrito anteriormente en extractos (*Krygier y col., 1982*), por lo que podría ser interesante una optimización del tipo de hidrólisis para minimizar la posible degradación.

- Por otro lado la determinación de PA ha sido ampliamente abordada en esta memoria habiéndose identificado y cuantificado las PA extraíbles (PAE) presentes en los extractos de diferentes frutas para después comparar estos valores con los contenidos de PA no extraíbles (PANE). Los resultados han mostrado que existe de manera general una subestimación en la determinación de PA en los alimentos ya que en la literatura la mayor parte de los trabajos únicamente analizan estos compuestos en los extractos acuoso-orgánicos, ignorando que la mayor parte de PA quedan sin extraer en el residuo. Es preciso comentar que nuestros resultados obtenidos para PAE se obtuvieron del análisis de los extractos metanol/acetona, mientras que la extracción típica en literatura es la que emplea acetona: agua: ácido acético (70:29.5:0.5) (*Gu y col., 2002*). Por este motivo los resultados de PAE presentados pueden diferir de los reportados en literatura. También cabe mencionar que los ensayos por buscar un método para la identificación de PANE por HPLC han llevado a la conclusión de que tanto las hidrólisis enzimáticas como la depolimerización con nucleófilos mediante tiólisis del residuo consiguen sólo valores parciales del contenido total de PANE en el residuo, significativamente menores que los valores obtenidos por el método químico propuesto (butanol/HCl), más cercanos al contenido real de PANE. No obstante estos ensayos dan información cualitativa de interés al identificar estructuras derivadas de flavan-3 oles.

En éste método se han optimizado las condiciones (tiempo, temperatura, longitud de onda, patrones) y se ha propuesto la curva de calibrado óptima para la cuantificación de PANE basada en un patrón de concentrado de PA cuyo espectro UV-VIS se ajusta perfectamente a las PANE encontradas en diferentes alimentos que las contienen como son frutas, legumbres y frutos secos. No obstante, la depolimerización completa sin

degradación, de las PANE que permita su identificación estructural por HPLC-MS es una tarea pendiente.

Los análisis realizados para frutos secos proporcionan resultados útiles a la hora de analizar el contenido polifenólico de este grupo de alimentos. Puesto que la grasa ejerce un papel como interferencia en la medida de CAO y polifenoles y debido a que la fracción polifenólica se encuentra localizada en la parte desgrasada de estos frutos, los análisis posteriores de PE y PNE por HPLC se realizaron directamente en la materia desgrasada.

Tras ampliar el conocimiento de la metodología existente para la determinación de PE y PNE de alimentos de diferente naturaleza, se decidió, de una manera simplificada, obtener una estimación de la ingesta diaria de polifenoles totales en la dieta española. La utilización de mezclas de alimentos representativas de los diferentes grupos de alimentos permitió analizar el contenido total de polifenoles de los alimentos vegetales consumidos en la dieta española. Queda pendiente llevar a cabo estos análisis en cada alimento individualmente, lo que ampliará la aplicabilidad de los resultados.

La ingesta diaria de polifenoles totales en la dieta española (año 2006), estimada a partir de análisis por HPLC-MS, es de 1218 mg/día/persona donde 971 mg son PNE y 247 mg son PE. Si a este valor le añadimos la ingesta de compuestos polifenólicos proporcionada por el consumo de bebidas y aceites en la dieta española descrito anteriormente por *Saura-Calixto y col. (2007)* (622 mg/día), la ingesta total de polifenoles asciende a un valor de unos 1840 mg/día, de los cuales 970 mg serían PE y 870 mg PNE. Son valores probablemente superiores a los publicados en la literatura para dietas (1g día) (*Ovaskainen y col., 2008; Thu y col., 2004*). La determinación de polifenoles en bebidas y aceites no ha sido uno de los objetivos de este trabajo puesto que existe información completa sobre los mismos (*Fukushima y col., 2009; Yang y col., 2008; Cooper y col., 2008; Risso y col., 2007; Tripoli y col., 2005; Waterhouse, 2002*) y estos muestran contenidos exclusivamente de PE, sin presencia de PNE, objeto fundamental de esta Memoria.

Finalmente es necesario resaltar la implicación nutricional que estos resultados pueden tener. Mientras que la mayoría de los estudios se centran en la evaluación de las propiedades biológicas, biodisponibilidad, metabolismo y efectos sistémicos de PE y alimentos ricos en PE, los valores que se muestran en esta Memoria indican que alrededor de 1 g/día de PNE pueden estar alcanzando el colon donde además de

aumentar el estatus antioxidante, sirven de sustrato a la microflora colónica que es capaz de metabolizarlos convirtiéndolos en compuestos capaces de ser absorbidos a través de la mucosa (*Selma y col., 2009; Crozier y col., 2009; Saura-Calixto y col., 2007; Clifford, 2004*). Los estudios existentes sobre metabolismo de taninos hidrolizables y proantocianidinas no extraíbles demuestran el potencial efecto quicio-preventivo a través de diferentes mecanismos tales como inducción de apoptosis, inhibición de señales de inflamación o aumento de ambiente antioxidante en colon (*Serrano y col., 2009; Knasmuller y col., 2009; Rodríguez y col., 2008; Larrosa y col., 2006*).

5. CONCLUSIONES GENERALES

La investigación desarrollada a lo largo de estos cuatro años de trabajo, el desarrollo de los procesos analíticos y los resultados presentados en esta Memoria, recogidos en las publicaciones científicas, permiten extraer las siguientes conclusiones generales:

1.

- a) La determinación del total de los compuestos polifenólicos en alimentos de origen vegetal requiere, adicional a la determinación usual de polifenoles extraíbles (PE) en extractos acuoso-orgánicos, análisis específicos de polifenoles no extraíbles (PNE), determinados en los hidrolizados del residuo obtenido tras dicha extracción.
- b) La cuantificación de polifenoles totales en algunas frutas y cereales muestra que las cantidades de PNE, incluyendo PH y PANE, son significativamente mayores que las concentraciones de PE y PAE.
- c) Se han establecido las condiciones experimentales y el patrón adecuado para estimar el contenido de PANE, tras depolimerización de PA mediante hidrólisis ácida con butanol/HCl/FeCl₃
- d) La hidrólisis ácida con metanol/H₂SO₄ a altas temperaturas sobre el residuo de la extracción acuoso-orgánica, produce la liberación de una mayor cantidad de polifenoles hidrolizables (PH) que la hidrólisis básica (NaOH 2M) que comúnmente se utiliza en la determinación de polifenoles en cereales.

2.

- a) La mayor parte de los compuestos antioxidantes de los frutos secos se encuentran en la fracción desgrasada de los mismos, en forma de PNE. La contribución del aceite al total de la capacidad antioxidante del fruto seco es inferior al 5%.
- b) Es recomendable para la determinación de capacidad antioxidante en frutos secos la medida por separado en la fracción desgrasada y en el aceite para evitar interferencias por parte de este último.
- c) Existe una significativa correlación entre la capacidad antioxidante medida por el método DPPH y la estabilidad oxidativa determinada por el método de

Rancimat en los aceites de frutos secos analizados. Los tocoferoles parecen ser los principales compuestos responsables de esa capacidad antioxidante.

3.

- a) Los polifenoles no extraíbles y que generalmente son omitidos en los análisis de alimentos y en bases de datos, son mayoritarios en todos los alimentos vegetales (frutas, vegetales, cereales, frutos secos y legumbres) y en la dieta.
- b) La ingesta diaria de polifenoles en la dieta española., incluyendo PE y PNE, derivada de alimentos vegetales se estima alrededor de 1200 mg/persona/día, (971 mg de PNE y 247 mg de PE). Las frutas y hortalizas son la principal fuente de polifenoles en la dieta (>60 %).
- c) Los polifenoles identificados como mayoritarios en la dieta española son flavonoles, flavan-3-oles, flavanones y antocianidinas entre los PE y los ácidos benzoicos, ácidos hidroxicinámicos, monómeros y polímeros de proantocianidinas entre los PNE.

6. ANEXO I: MÉTODOLOGÍA

1. Extracción de polifenoles

A) Polifenoles extraíbles (PE): En tubos de centrifuga de 50 ml, 0.5 g de muestra liofilizada, molida y tamizada (0.5 mm diámetro) se tratan en un primer paso con 20 ml de una mezcla de metanol (HCl): agua (80:20, v:v), pH 2 agitando constantemente durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se centrifuga durante 15 minutos a 3000 rpm recogiendo el primer sobrenadante en matraces de 50 ml. Sobre el residuo se añaden 20 ml de una mezcla acetona: agua (70:30, v:v) y se procede con la agitación y la centrifugación de la misma manera obteniéndose un segundo sobrenadante que se combina con el anterior y se lleva a un volumen de 50 ml. Este extracto se empleará para la determinación de PE mediante HPLC-DAD-MS y de PAE por HPLC-fluorescencia.

B) Polifenoles no extraíbles (PNE): Sobre el residuo obtenido tras la extracción metanol-acetona mencionada anteriormente, se realizan dos tipos de hidrólisis según el tipo de compuesto que queramos determinar.

- **Polifenoles hidrolizables (hidrólisis ácida):** Se somete el residuo (unos 0.2 g) a una hidrólisis con metanol:H₂SO₄ (90:10, v:v) agitando en baño a 85°C y durante 20 horas. Pasado este tiempo se centrifuga 15 minutos a 3000 rpm y se recoge sobrenadante. Se lava el residuo dos veces más y se enrasa en matraz de 50 ml. Estos hidrolizados se utilizan para la determinación por HPLC-MS de PH.

- **Polifenoles hidrolizables (hidrólisis básica):** Se somete el residuo (0.2 g) a hidrólisis alcalina con 15 ml de NaOH 2M a temperatura ambiente durante 4 horas con agitación. Después se centrifuga y se recoge el sobrenadante que se lleva a pH 4 y a un volumen final de 20 ml. Este hidrolizado se utilizó para la determinación por HPLC de PH en cereales.

- **Proantocianidinas no extraíbles (PANE):** En otro tratamiento diferente del residuo (0.2 g) este se somete a una hidrólisis ácida con butanol: HCl (FeCl₃) (95.5:5.5, v:v) a 100°C durante 1 hora con agitación. Trascurrido ese tiempo se centrifuga durante 15 min a 3000 rpm y se recoge sobrenadante que contiene la solución de antocianidinas que se enrasa a 25 ml. Esta solución será utilizada para la medida espectrofotométrica de PANE.

2. Determinación de PE por HPLC-DAD-MS:

Basada en el método de *Tomás-Barberán y col. (2001)*. Los extractos metanol-acetona fueron concentrados 10 veces en rota vapor a temperatura ambiente. El concentrado fue

filtrado (filtros Teknokroma de 0.45 µm) y 20 µl fueron inyectados en un HPLC-1100 de Agilent utilizando una columna Nucleosil C18 (150x4.6 mm, 5 µm) con precolumna de la misma fase estacionaria, un flujo de 1 ml/min y las siguientes fases móviles con el siguiente diagrama de flujo:

A: 95 % agua (ácido acético, 1%) + 5% metanol (ácido acético, 1%)

B: 88 % agua (ácido acético, 1%)+ 12% metanol (ácido acético, 1%)

C: 20 % agua (ácido acético, 1%)+ 80% metanol (ácido acético, 1%)

D: 100 % metanol (ácido acético, 1%)

Diagrama:

t	%	Duración
0 min	100 A	5 min
5-10 min	100 B	5+3 min
13-35 min	75 B + 25 C	22 min
35-50 min	50 B + 50 C	15 min
50-52 min	100 C	2+7 min
57-60 min	100 D	3 min
57-60 min	100 D	3 min
60- 62 min	100 A	2 min

Longitudes de onda en DAD: 280 nm, 320 nm, 360 nm y 510 nm.

Espectrometría de masas (MS): Se utilizó un detector de MS de tipo cuadrupolo simple de Agilent acoplado al sistema de HPLC-DAD. Para el análisis de masas se ajustó la fuente de ionización de electrospray (ESI) a presión atmosférica operando en modo de ionización negativo. Se trabajó con un voltaje capilar de 3000 V, con nitrógeno como gas nebulizador a un flujo de 12 L/h y la temperatura de secado de 300°C. El espectro de MS fue adquirido en modo scan con un rango de masas de m/z de 100 a 1000. Se utilizarán patrones para la cuantificación.

3. **Determinación por HPLC-Fluorescencia de PAE:** En los extractos metanol-acetona también concentrados y filtrados fueron inyectados 5 µl en un HPLC-1100 de Agilent que operaba con una columna Phenomenex Luna de sílica de 25x4.6 mm a 37°C. El sistema de detección y análisis se basó en el método de *Gu y col., 2002* y *Prior*

y *Gu, 2005*, usando fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 276 nm y de emisión de 316 nm. El flujo de trabajo fue de 1 ml/min y las fases móviles fueron:

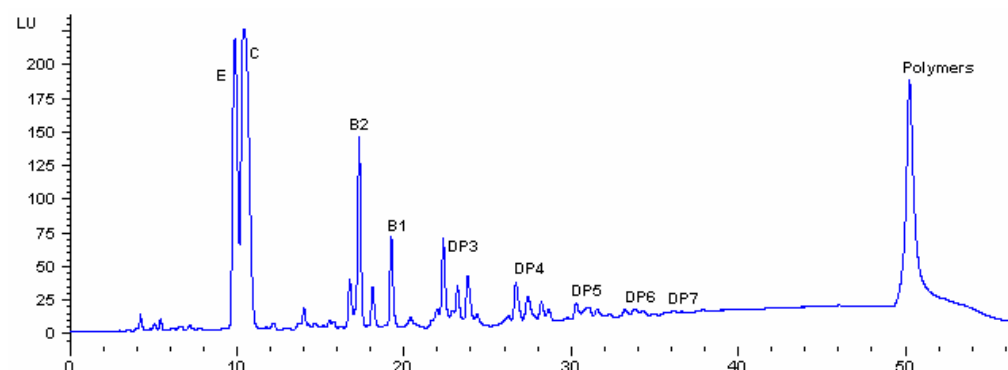
A: 82% diclorometano

B: 14% metanol

C: 4% (ácido acético: agua, 50:50, v:v)

Diagrama de flujo: Isocrático

Los patrones que se utilizaron fueron los compuestos correspondientes a un extracto de pepita de uva para cuantificar oligómeros y polímeros, catequina, epicatequina, procianidina B1 y procianidina B2. El espectro se presenta a continuación:



4. **Determinación por HPLC-DAD-MS de PH:** Los hidrolizados ácidos (metanol/H₂SO₄) fueron filtrados (Teknokroma 0.45 µm) y 20 µl fueron inyectados en un equipo HPLC 1100 de Agilent con una columna Gemini C18 (250x4.6 mm, 5 µm) y precolumna del mismo material, apropiada para un amplio rango de pH. El flujo fue de 1 ml/min con las fases móviles:

A: Agua + Ácido Fórmico 0.1%

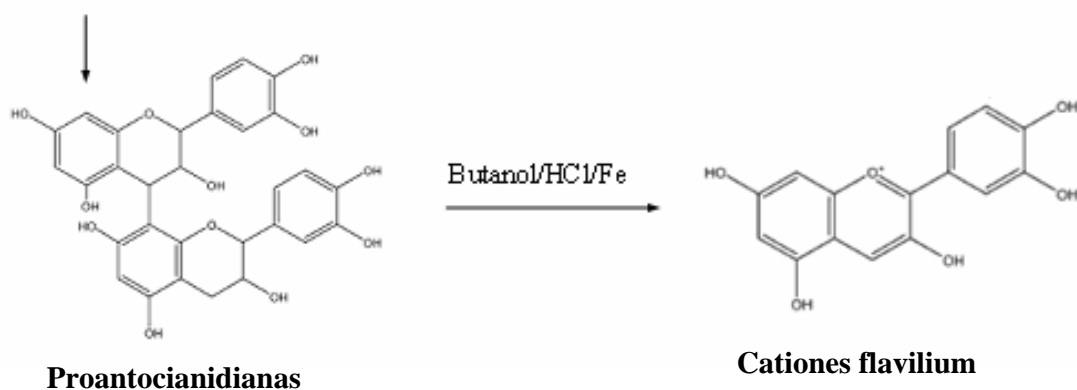
B: Acetonitrilo + Ácido Fórmico 0.1%

Diagrama de flujo:

tiempo	% B
0	0
5	0
15	17
17	17
22	25
30	35
35	50
40	100
50	100
55	0
65	0

La adquisición de cromatogramas en DAD se hizo a 280, 320, 360 y 510 nm y los espectros de masas se obtuvieron con el mismo detector de masas que para los PE pero esta vez trabajando en modo de ionización positivo. La cuantificación se realizó con patrones conocidos. El procedimiento se basa en el descrito por *Bennett y col. (2004)*.

5. **Determinación espectrofotométrica de PANE:** Tras la hidrólisis ácida con butanol del residuo se obtiene es una solución rojiza de cationes flavilium, derivados de la depolimerización de PA. Se mide directamente la absorbancia (Perkin Elmer, Lambda 12) a 554 nm y la cuantificación se realiza con un patrón de concentrado de PA.



6. Desgrasado de frutos secos a temperatura ambiente:

Los frutos secos son molidos y tamizados (0.5 mm partícula) para ser homogeneizados. A continuación 0.5 g de fruto seco homogeneizado es colocado en un tubo de centrifuga de 50 mL al que se le añaden 20 ml de éter de petróleo y se agita durante 20 minutos. Después se centrifuga a 2500g durante 10 minutos, se recoge el sobrenadante y finalmente se evaporará el éter con N₂ para obtener el aceite del fruto seco.

7. Extracción de fracciones polar y apolar de aceites:

La extracción de las fracciones, polar y apolar, de los aceites se obtiene mediante tratamiento de 5 mL de aceite con 5 mL de metanol que se agitará durante 20 minutos y a continuación se centrifugará 10 min a 2500g. El sobrenadante se recoge y el residuo se vuelve a extraer con otros 5 mL de metanol repitiéndose el proceso anterior. Así se obtiene la fracción polar (metanólica) y la fracción apolar (aceite remanente).

8. Determinación de capacidad antioxidante (CAO) por ABTS en punto fijo:

La medida de capacidad antioxidante (CAO) por el método ABTS se basa en la capacidad que tienen algunos antioxidantes de capturar radicales libres. De este modo lo que se hace en este método es generar una solución de cationes radicales ABTS^{*+} disolviendo 38.4 mg de ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) en 10 ml de una solución de persulfato potásico preparado con 66 mg en 100 ml. Se deja agitando una noche en la oscuridad. Tras ese periodo se diluye en metanol hasta que se alcance la absorbancia de 0.7 ± 0.02 medida a 658 nm. Una vez obtenida la solución radicalaria de trabajo, en una cubeta de espectro de 4 ml se adicionan 100 µl de muestra o de Trolox (patrón) y 3.9 ml de solución de ABTS^{*+} y se leerá (espectrofotómetro Beckman DU-460) la absorbancia de las muestras frente a la de un blanco de disolvente cada 20 segundos durante 6 min. Se representará el % de inhibición respecto del blanco frente al tiempo y se calculará el área bajo la curva de 0 a 6 min. Como curva de calibrado se utilizarán diferentes concentraciones conocidas de Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2-carboxílico) (*Re y col., 1999*).

9. Determinación de CAO por ABTS cinético:

En este método se generará la solución de trabajo (ABTS^{*+}) de la misma manera descrita anteriormente pero se procederá de una manera diferente según describe *Pérez-Jiménez y col., (2005)* para la determinación de parámetros cinéticos de la CAO. Una alícuota de 100 µl de muestra se adiciona a 3.9 ml de solución de ABTS^{*+}. La absorbancia es medida a 515 nm a diferentes intervalos de tiempo en un Beckman DU-460 hasta que la reacción alcance el final (cuando la absorbancia se estabiliza). La concentración de ABTS^{*+} en el medio se calculará con la curva de calibrado, representando concentración frente a absorbancia. El porcentaje de remanencia del ABTS^{*+} respecto del blanco frente a la concentración de la muestra es representado para calcular el parámetro EC₅₀ que es la concentración necesaria de muestra para alcanzar el 50% de remanencia. El t_{EC50} fue también calculado gráficamente. De estos dos parámetros puede definirse la eficacia antioxidante ($EA = 1/(EC_{50} \times t_{EC50})$).

10. Determinación de CAO por FRAP:

La medida de CAO por FRAP determina el poder reductor que tienen las sustancias antioxidantes. Para ello, 900 µL de reactivo FRAP que contiene TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina), FeCl₃ y tampón acetato, se mezclan con 90 µL de agua destilada y 30 µL de muestra o blanco (disolvente). A continuación se toma la absorbancia máxima que se registra cada 15 segundos durante 30 minutos a una temperatura de 37°C y a 595 nm utilizando un Beckman DU-640 equipado con baño termostatzado siguiendo el método de *Benzie y col., (1996)* y *Pulido y col. (2000)*. Finalmente la capacidad antioxidante se expresará en equivalentes de Trolox.

11. Determinación de CAO por ORAC:

Basado en el método de *Ou y col., (2001)* con alguna modificación: Se mezclan 175 µL de extracto o blanco con 120 µL de PBS a pH= 7.4 75 mM, 205 µL de solución AAPH 53 mM y 3 mL de fluoresceína 48 nM. A continuación se registrará la bajada de fluorescencia que tiene lugar en presencia de la sustancia antioxidante hasta que esta llegue a cero en un fluorímetro Perkin Elmer LS 55 equipado con un holder termostatzado a 37°C y trabajando a una longitud de onda de excitación de 493 nm y de emisión de 515 nm. Se calculará la diferencia de áreas bajo la curva de descenso de fluorescencia entre la del blanco y la de la muestra y se expresará finalmente en equivalentes de Trolox.

12. Determinación de CAO por DPPH en extractos:

Basado en el método de *Brand-Williams y col., (1995)*, modificado por *Sánchez-Moreno y col., (1998)* para determinar la capacidad antiradicalaria en términos cinéticos. Después de ajustar el espectrofotómetro (Beckman DU-640) con un blanco de metanol, en una cubeta se mezclan 3.9 mL de solución metanólica de DPPH* (2,2-difenil-1-picrilhidracil) (60 µM) con 0.1 mL de muestra. Se mide la absorbancia que se va registrando a 515 nm hasta alcanzar la saturación. Se realiza una curva de calibrado a 515 nm para obtener el DPPH remanente. Se obtendrá el parámetro EC₅₀ que refleja la desaparición del 50% de radicales DPPH* y que viene expresado como g materia seca/g DPPH. El tiempo que se emplea en alcanzar esta concentración EC₅₀ se denomina t_{EC50} y la eficacia antiradicalaria viene expresada como $EA = 1/(EC_{50} \times t_{EC50})$.

13. Determinación de CAO por DPPH en aceites:

Para determinar esta capacidad antiradicalaria en los aceites y en los aceites remanentes tras la extracción con metanol, se utiliza el mismo procedimiento descrito en el punto anterior pero el DPPH es disuelto en acetato de etilo (1:1), como ya ha sido descrito por *Espin y col., (2000)* expresando EC₅₀ en g de aceite/g DPPH.

14. Extracción de proantocianidinas mediante hidrólisis enzimáticas:

Los residuos obtenidos tras la extracción metanol-acetona se trataron con tres enzimas comerciales diferentes: Peptinasa 690L, Depol 740L, Promod 439L y la mezcla de las tres enzimas siguiendo el procedimiento anteriormente descrito por *Mandalari y col., (2006)*. Tres alícuotas de 50 mg del residuo seco (40°C durante una noche) fueron utilizadas para cada enzima y otra alícuota fue empleada como control sin enzimas. A continuación cada alícuota con su enzima fue incubada bajo unas condiciones específicas de cada enzima (ver tabla más abajo). Después se enfriaron y centrifugaron a 17000g, 4°C, 10 minutos, recogiendo los sobrenadantes para cuantificar PANE por HPLC-fluorescencia como ha sido descrito en el punto 3.

ANEXO I: METODOLOGÍA

Enzimas	Concentración de enzima (µL/g residuo)	Tampón	pH de trabajo	Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (h)
Peptinasa 690 L	74	Acetato sódico	5	37	24
Depol 740L (esterasa)	120	Fosfato	7	55	5
Promod 439L (proteasa)	20	Tris-Maleato	9	55	5
Mezcla de las tres enzimas	214	Fosfato	7	55	5

CONGRESOS



COMUNICACIÓN ORAL:

AVANCES EN EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EXTRAIBLES Y NO EXTRAIBLES PROCEDENTES DEL CONSUMO DE FRUTA DE LA DIETA ESPAÑOLA

Arranz, S. y Saura-Calixto, F.

Dpto. Metabolismo y Nutrición. Instituto del Frio-ICTAN (CSIC), Madrid 28040
sararranz@if.csic.es

Introducción

Los datos bibliográficos sobre el contenido y composición de compuestos polifenólicos en alimentos se centran en la caracterización de los compuestos extraíbles con disolventes acuoso-orgánicos ignorando en la mayoría de los casos los compuestos polifenólicos no extraíbles, presentes en el residuo de extracción.

El objetivo general de este trabajo es la determinación de la ingesta de compuestos polifenólicos extraíbles (PPE) y no extraíbles (PPNE), taninos hidrolizables y condensados, procedentes de las frutas.

Materiales y Métodos

Se pesó la fracción comestible de cada fruta consumida en España en cantidades equivalentes a la cantidad consumida por persona/día (MAPA, 2006). El conjunto de frutas pesadas se agrupó en una mezcla, la cual fue liofilizada y molida para posteriormente ser utilizada en la obtención de EPP, solubles en metanol-acetona, pH2 (Saura-Calixto y col., 2007) y analizados después por HPLC-DAD-MS (Tomás-Barberán y col., 2001). En estos mismos extractos se analizaron por fase normal-HPLC-FL proantocianidinas solubles (Gu y col., 2002; Prior & Gu, 2005).

Los residuos resultantes de la extracción fueron utilizados para la obtención de taninos hidrolizables mediante metanólisis (Hartzfeld et al., 2002) y cuantificación por HPLC-DAD-MS (Bennett y col., 2004). En los mismos residuos se midieron taninos condensados tras hidrólisis con butanol-HCl-Fe (Saura-Calixto y col., 2007).

Resultados y Discusión

Los principales compuestos extraíbles identificados y cuantificados por HPLC-DAD-MS pertenecen al grupo de las flavanonas (hesperidina, naringina), posiblemente debido a que el grupo de los cítricos, ricos en ese tipo de compuestos, tienen una alta ingesta en la dieta. También se identificaron flavan-3-oles (epicatequina y galocatequina) y flavonoles (quercetin-glucósido y ramnosido) y algunas cianidinas (cianidin-glucósido y pelargonidin-glucósido). El contenido total de PPE es de aproximadamente 58 mg/100 g mezcla fresca.

Adicionalmente se determinaron proantocianidinas (PA) (monómeros y oligómeros de flavan-3-oles) en los mismos extractos en cantidades aproximadas de 8

mg/100 g mezcla fresca.

En los residuos de la extracción se identifican por primera vez tras metanólisis, en cantidades significativas (95 mg/100 g mezcla fresca) como constituyentes mayoritarios, los ácidos hidroxycinámicos (ferúlico y cafeico), ácidos benzoicos (gálico e hidroxibenzoico) y flavan-3-oles (catequina y galocatequina).

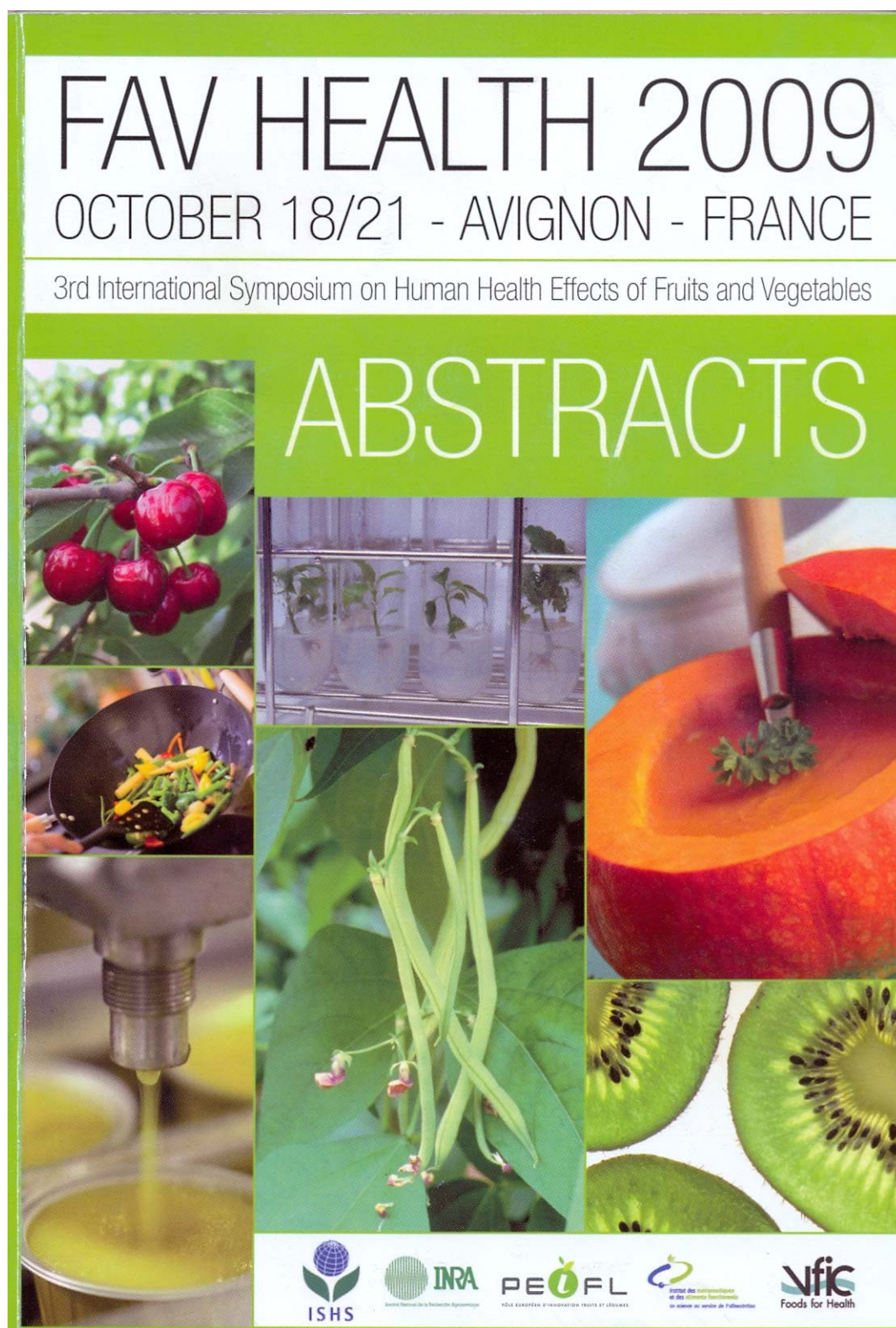
Igualmente se cuantificaron las PA no extraíbles asociadas a fibra dietética tras depolimerización con butanol/HCl/Fe obteniéndose valores de 133 mg/100 g mf.

En base a estos análisis se estima que la ingesta diaria de polifenoles extraíbles en la dieta española procedente de frutas es del orden de 116 mg/persona mientras que la de polifenoles no extraíbles (hidrolizables + proantocianidinas no extraíbles) supone aproximadamente 420 mg/persona. Estos resultados muestran que el contenido de polifenoles no extraíbles en frutas y generalmente no considerados en la literatura, puede ser superior al de los polifenoles extraíbles.

Los estudios de nutrición y salud relacionados con la ingesta de PP generalmente sólo consideran los PPE. Los PPNE son también compuestos biodisponibles que pueden tener efectos biológicos significativos, dado que tras la fermentación colónica se liberan y producen diversos metabolitos antioxidantes.

Bibliografía

- Bennett, R.N. et al. (2004). J. Agric. Food Chem., 52, 5856-5862.
Gu, L., Kelm, M., Hammerstone, J.F., Beecher, G. et al. (2002). J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 4852-60.
Hartzfeld, P. W. et al. (2002). J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 1785-1790.
MAPA (2006). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. www.mapa.es
Prior, RL and Gu, L., 2005. Phytochemistry, 66, 2264-2280.
Saura-calixto, F., Serrano, J. & Goñi, I. (2007). Food Chemistry, 101, 492-501.
Toma_s-Barbera_n, F.A., Gil, M.I., Cremin, P., Waterhouse, A.L., Hess-Pierce, B. y Kader, A.A.(2001). J. Agric. Food Chem., 49 (10), 4748-4760.



COMUNICACIÓN ORAL:

S2L1 Contribution of Fruit and Vegetables to the Intake of Dietary Fibre and Antioxidants In the Mediterranean Diet

I. Goñi, J. Pérez-Jiménez, S. Arranz & F. Saura-Calixto

Nutrition and Gastrointestinal Unit UCM/CSIC - Facultad de Farmacia – ICTAN. 28040-Madrid, Spain

There is growing scientific evidence that a sufficient daily intake of dietary fibre (DF) and antioxidants may be a critical mediator of the lower mortality associated with the Mediterranean diet (Saura-Calixto, F. & Goñi, I. Definition of the Mediterranean diet based on bioactive compounds. *Critical Rev Food Sci Nutr*. 49, 145, 2009).

Fruit and vegetable contain significant amounts of dietary fiber (DF) and antioxidant which may be essential contributors to the health benefits associated with a daily consumption of at least 400 g of these plant foods.

The antioxidant capacity (AC) of fruit and vegetable, generally measured in aqueous-organic extracts, is derived from the accumulative and synergistic antioxidant power of vitamins, polyphenols, carotenoids and other minor constituents. Moreover, DF transports a significant amount of non-extractable polyphenols and carotenoids linked to the fiber matrix through the human gut, which are not taken into account in both chemical and nutritional studies.

This communication focuses on the contribution of fruit and vegetables to the intake of DF and antioxidants in the Mediterranean diet.

DF content and total AC were determined in 21 fruits and 24 vegetables included in Spanish National Food consumption data

The intake of DF in the Spanish Mediterranean diet, has been estimated at 18.30 g/person/day. The consumption of fruit and vegetables (266 g of fruits and 331 g of vegetables) accounts for 54% of total DF. These figures are based on a definition of DF as plant polysaccharides and lignin. The inclusion of other indigestible compounds in a wider concept of DF would produce higher intake figures, estimated at 45 to 60 g/person/day (2).

AC in aqueous-organic extracts of the Spanish diet was estimated at 3500 μmol trolox equivalents by ABTS method (Saura-Calixto, F. & Goñi, I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chem*, 94, 442, 2006).

The largest contributors were beverages (about 68%) and fruits and vegetables (about 20%). In addition, the DF supplied by fruit and vegetable transports non-extractable antioxidants (around 600 mg of polyphenols and 7 mg of carotenoids) which provide a significant AC that can counteracts dietary pro-oxidants in the colonic lumen.

COMUNICACIÓN ORAL:

S11SC1 Non Extractable Proanthocyanidins in Fruits: A Major Phytochemical not Considered in Literature Data

Jara Pérez-Jiménez (1) , Sara Arranz (1) , Fulgencio Saura-Calixto(1).

(1) Department of Metabolism and Nutrition (ICTAN- CSIC). C/ José Antonio Novais, 10, 28040, Madrid, Spain.

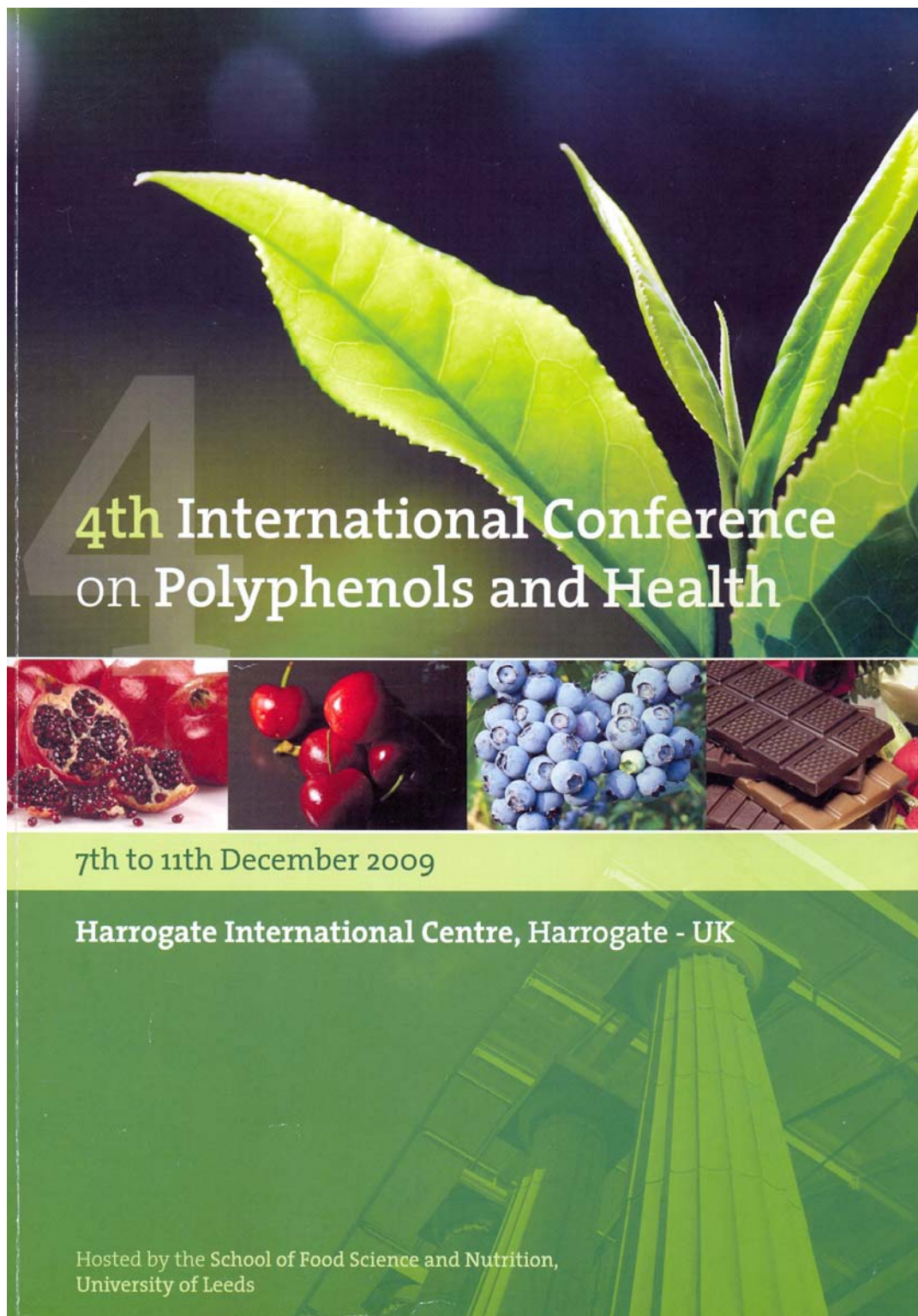
*Current address: Unité de Nutrition Humaine, Centre de Recherches INRA Clermont-Ferrand/Theix, 63122 Saint-Genes Champanelle, France.

Proanthocyanidins (PA) or condensed tannins, a major group of polyphenols, are oligomers and polymers of flavan-3-ol and flavan-3, 4-diols widely distributed in plant foods. Most literature data on PA content come from determinations in aqueous organic extracts of foods, that is extractable proanthocyanidins (EPA). However, a major proportion of high-molecular-weight PA and PA complexed with protein or cell-wall polysaccharides remain insoluble. These non-extractable PA (NEPA) are usually not taken into account in chemical and nutritional studies, despite they may have significant effects on health.

Objectives: The general aim of this work was the determination of the total content of PA in fruits consumed in common diets, including both EPA (HPLC analysis in methanol-acetone-water extracts) and NEPA(spectrophotometric analysis in hydrolyzates of the corresponding residues of extraction). The underestimation of proanthocyanidins content in currently available databases and scientific publications will be also considered.

Results & Discussion: NEPA were determined in several common fruits (banana, apple, pear, grape, cherry, nectarine, peach, strawberry), with contents ranging from 32 to 6,700 mg/100 g dry weight. The inclusion of NEPA as a part of food proanthocyanidins would also modify the reported dietary intakes of proanthocyanidins. These have been estimated, considering only EPA, at 57.7 mg per day in the US diet (1) or 120 mg per day in the Finnish diet (2). The daily intake of NEPA in the Spanish diet is estimated about 500 mg, of which around a 75% comes from fruits.

These missing phytochemicals in food analysis, are bioactive compounds in the gut that reach the colon releasing absorbable compounds and antioxidant metabolites by the action of the colonic microflora. This is a first approach to the pending task of systematic determination of NEPA content in fruits, in order to determine their contribution to the observed promoting-health effect of fruit polyphenols.



COMUNICACIÓN ORAL:

048

Determination of nonextractable polyphenols suggest the underestimation of the actual dietary intakes and food content of polyphenols in literature data: A study in the Spanish Mediterranean diet

Saura-Calixto, F and Arranz, S

Department of Metabolism and Nutrition, ICTAN (CSIC), Madrid, Spain

Introduction

The approach of our group to polyphenols analysis intends to show that literature data on food polyphenols are partial and insufficient because they are generally referred to extractable polyphenols (EPP) analysed in aqueous-organic extracts. Significant amounts of bioactive polyphenols that remain in the residues of extraction (nonextractable polyphenols -NEPP) are usually not considered. Recent studies on total content of polyphenols, including proanthocyanidins (1,2) in some fruits and intakes in a whole diet (3) suggested that the actual content of polyphenols in foods and diets largely exceed the data reported in the literature. **Objectives** The main objective of this work was to determine the dietary intake of polyphenols, including EPP (monomers to oligomers) and NEPP (polymers and PP associated with dietary fibre and protein) in the Spanish Mediterranean diet. **Results & Discussion** Plant foods included in Spanish National Food Consumption Data (fruits, vegetables, cereals, legumes and nuts) were analysed. Analysis of EPP and NEPP were performed by HPLC-MS in aqueous-organic extracts and in acidic hydrolyzates of the corresponding residues. Results showed that the daily intake of polyphenols derived from plant foods was about 1100 mg/day. NEPP, including hydrolysable polyphenols and nonextractable proanthocyanidins, was the major fraction (875 mg/day). The main identified structures were benzoic and hydroxycinnamic acids, flavonols, flavan-3-ols, flavanones and anthocyanidins in EPP and benzoic and hydroxycinnamic acids, monomers of flavan-3-ols and high molecular weight proanthocyanidins in NEPP. (Data on intake of PP derived from beverages will be also presented). The inclusion of this large fraction of bioactive polyphenols in food composition data may be useful for a better understanding of biological and health effects of this dietary constituents.

(1) Arranz and Saura-Calixto, 2009. J. Agric. Food Chem. (DOI: DOI:10.1021/jf9016652))

(2) Pérez-Jiménez et al., 2009. Food Res. Inter. (DOI : 10.1016/j.foodres.2009.07.002))

(3) Saura-Calixto et al., 2007. Food Chem., 101, 492-501.

POSTER:**P247****The methodology for determination of polyphenols in cereals may be improved by analyzing nonextractable polyphenols in acidic hydrolyzates**Arranz, S and Saura-Calixto, F

ICTAN (CSIC), Madrid, Spain

Introduction

Most reported analytical studies on polyphenols in cereals are referred to compounds determined in aqueous-organic extracts and alkali hydrolysates. Alkali treatment is recommended to obtain free polyphenols avoiding degradation of hydroxycinnamic acids. However an appreciable amount of polyphenols trapped in cores or bound to cell wall constituents may remain insoluble after aqueous-organic extraction and/or alkali treatment. Acidic hydrolysis may be useful to achieve a more complete release of insoluble polyphenols associated with cell walls.

Objectives

The general aim of this work was the determination of the total content of PP in cereals, including HPLC-MS analysis in methanol-acetone-water extracts and in acidic and alkali hydrolysates of the corresponding residues.

Results & Discussion

Wheat flour and bran were used as test samples. The amount of polyphenols found in extracts of wheat flour and wheat bran were 109 and 161 mg/100 g weight respectively. Hydroxybenzoic, ellagic acid, epicatechin and hydroxycinnamic acids were the main compounds identified. The amount of PP found in acidic hydrolysates of wheat flour and bran (240 and 1600 mg/100 g respectively) were higher than in alkali hydrolysates (0.2 and 372 mg/100 g respectively). Hydroxybenzoic, caffeic, cinnamic, ferulic, protocatechuic acids were the main constituents of the hydrolysates. The acidic hydrolysis, usually omitted in analysis of polyphenols in cereals may be useful to obtain polyphenols contents closer to the actual values.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6182-6187.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125(5), 989-1009.
- Arts, I. C. W., Van De Putte, B., & Hollman, P. C. H. (2000). Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1746-1751.
- Aviram, M. et al. (2002). Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: Studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs under experimental and clinical research*, 28(2-3), 49-62.
- Barnes, S., Coward, L., Kirk, M., & Sfakianos, J. (1998). HPLC-mass spectrometry analysis of isoflavones. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 217(3), 254-262.
- Beecher, G. R. (2003). Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake. *Journal of Nutrition*, 133(10)
- Bennett, R.N., Mellon, F.A., Rosa, E.A.S., Perkins, L. & Kroon, P.A. (2004). Profiling glucosinolates, flavonoids, alkaloids and other secondary metabolites in tissues of *Azima tetracantha* L. (Salvadoraceae). *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5856-5862.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 28: 25-30.
- Benzie IFF, Strain JJ (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.
- Brat, P. et al. (2006). Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *Journal of Nutrition*, 136(9), 2368-2373.
- Bravo, L., Abia, R., & Saura-Calixto, F. (1994). Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(7), 1481-1487.
- Burns, R.E. (1971). *Agron. J.* 63, 511
- Cabrera, C., Giménez, R., & López, M. C. (2003). Determination of tea components with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4427-4435.
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2002). Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5939-5946.
- Cerdá, B., Periago, P., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2005). Identification of urolithin A as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5571-5576.

- Chantre, P., & Lairon, D. (2002). Recent findings of green tea extract AR25 (exolise) and its activity for the treatment of obesity. *Phytomedicine*, 9(1), 3-8.
- Chopra, M., O'Neill, M. E., Keogh, N., Wortley, G., Southon, S., & Thurnham, D. I. (2000). Influence of increased fruit and vegetable intake on plasma and lipoprotein carotenoids and LDL oxidation in smokers and nonsmokers. *Clinical chemistry*, 46(11), 1818-1829.
- Clifford, M. N. (2004). Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Medica*, 70(12), 1103-1114.
- Clifford, M. N., & Scalbert, A. (2000). Ellagitannins - Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the science of food and agriculture*, 80(7), 1118-1125.
- Cooper, K. A., Donovan, J. L., Waterhouse, A. I., & Williamson, G. (2008). Cocoa and health: A decade of research. *British Journal of Nutrition*, 99(1), 1-11.
- Cork, S. J., & Krockenberger, A. K. (1991). Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plants: Insights from investigations on Eucalyptus leaves. *Journal of chemical ecology*, 17(1), 123-134.
- Cottet, V. et al. (2005). Dietary patterns and the risk of colorectal adenoma recurrence in a European intervention trial. *European Journal of Cancer Prevention*, 14(1), 21-29.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural product reports*, 26(8), 1001-1043.
- Deshpande, S.S., Cheryan M. (1985) *Journal of Food Science*. 50, 905.
- Dobroslawski, B., Kasimsetty, S. G., Khan, S. I., & Daneel, F. (2009). Urolithins, intestinal microbial metabolites of pomegranate ~ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10181-10186.
- Edenharder, R., Keller, G., Platt, K. L., & Unger, K. K. (2001). Isolation and characterization of structurally novel antimutagenic flavonoids from spinach (*Spinacia oleracea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2767-2773.
- Espín JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ (2000). Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 648-656.
- EuroFIR: European Food Information Resource. Database of Plant foods and health: Focus on plant bioactives. (www.eurofir.net).
- Farah, R., Glick, Y., & Farah, R. (2008). Secrets of the mediterranean diet. *Harefuah*, 147(5), 422-427.
- Fraser, G. E. (1999). Nut consumption, lipids, and risk of a coronary event. *Clinical cardiology*, 22(7 SUPPL.)

- Freese, R. et al. (1999). Green tea extract decreases plasma malondialdehyde concentration but does not affect other indicators of oxidative stress, nitric oxide production, or hemostatic factors during a high-linoleic acid diet in healthy females. *European journal of nutrition*, 38(3), 149-157.
- Fukushima, Y. et al. (2009). Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1253-1259.
- Fulcrand, H., Remy, S., Souquet, J. -, Cheynier, V., & Moutounet, M. (1999). Study of wine tannin oligomers by on-line liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1023-1028.
- Garcia-Closas, R., Gonzalez, C. A., Agudo, A., & Riboli, E. (1999). Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes and Control*, 10(1), 71-75.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1370-1373.
- Granado, F., Olmedilla, B., Blanco, I., & Rojas-Hidalgo, E. (1996). Major fruit and vegetable contributors to the main serum carotenoids in the Spanish diet. *European journal of clinical nutrition*, 50(4), 246-250.
- Gu, L. et al. (2002). Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4852-4860.
- Guyot, S., Marnet, N., & Drilleau, J. -. (2001). Thiolytic - HPLC characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 14-20.
- Han, D. -, Denison, M. S., Tachibana, H., & Yamada, K. (2002). Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66(7), 1479-1487.
- Harris, W. S., Miller, M., Tighe, A. P., Davidson, M. H., & Schaefer, E. J. (2008). Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: Clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis*, 197(1), 12-24.
- Hartley, R., Green, M., Luccock, M. D., Ryan, S., & Forsythe, W. I. (1991). Solid phase extraction of oxcarbazepine and its metabolites from plasma for analysis by high performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, 5(5), 212-215.
- Hartzfeld, P. W., Forkner, R., Hunter, M. D., & Hagerman, A. E. (2002). Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1785-1790.

- Hellström, J. K., & Mattila, P. H. (2008). HPLC determination of extractable and unextractable proanthocyanidins in plant materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7617-7624.
- Herrmann, K. (1989). Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 28(4), 315-347.
- Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., & Kromhout, D. (1993). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342(8878), 1007-1011.
- Holst, B., & Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current opinion in biotechnology*, 19(2), 73-82.
- Hu, F. B. et al. (1998). Frequent nut consumption and risk of coronary heart disease in women: Prospective cohort study. *British medical journal*, 317(7169), 1341-1345.
- Hutabarat, L. S., Greenfield, H., & Mulholland, M. (2001). Isoflavones and Coumestrol in Soybeans and Soybean Products from Australia and Indonesia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14(1), 43-58.
- Jayagopal, V. et al. (2002). Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes care*, 25(10), 1709-1714.
- Jenkins, D. J. A. et al. (2000). Effect of soy protein foods on low-density lipoprotein oxidation and ex vivo sex hormone receptor activity - A controlled crossover trial. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 49(4), 537-543.
- Jiménez-Escrig, A., Santos-Hidalgo, A. B., & Saura-Calixto, F. (2006). Common sources and estimated intake of plant sterols in the Spanish diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3462-3471.
- Jiménez-Escrig, A., Dragsted, L. O., Daneshvar, B., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2003). In vitro antioxidant activities of edible artichoke (*Cynara scolymus* L.) and effect on biomarkers of antioxidants in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5540-5545.
- Ju, Z. Y., & Howard, L. R. (2003a). Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5207-5213.
- Ju, Z. Y., & Howard, L. R. (2003b). Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5207-5213.
- Khanna, S. K., Viswanathan, P. N., Krishnan, P. S., & Sanwal, G. G. (1968). Extraction of total phenolics in the presence of reducing agents. *Phytochemistry*, 7(9), 1513-1517.

- Kim, H. -, Kim, O. -, & Sung, M. -. (2003). Effects of phenol-depleted and phenol-rich diets on blood markers of oxidative stress, and urinary excretion of quercetin and kaempferol in healthy volunteers. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(3), 217-223.
- King, J. C., Blumberg, J., Ingwersen, L., Jenab, M., & Tucker, K. L. (2008). Tree nuts and peanuts as components of a healthy diet. *Journal of Nutrition*, 138(9)
- Knekt, P. et al. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76(3), 560-568.
- Knasmüller, S.; DeMarini, D.M., Johnson, I. and Gerhauser, C. (2009). Tannins: Bioavailability and Mechanisms of Action -Chemoprevention of Cancer and DNA Damage by Dietary Factors.-, Wiley-Blackwell, Weinheim, Germany, pp. 499-508.
- Kornsteiner, M., Wagner, K. -, & Elmadfa, I. (2006). Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry*, 98(2), 381-387.
- Kris-Etherton, P. M., Yu-Poth, S., Sabaté, J., Ratcliffe, H. E., Zhao, G., & Etherton, T. D. (1999). Nuts and their bioactive constituents: Effects on serum lipids and other factors that affect disease risk. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3 SUPPL.)
- Kris-Etherton, P. M., Zhao, G., Binkoski, A. E., Coval, S. M., & Etherton, T. D. (2001). The effects of nuts on coronary heart disease risk. *Nutrition reviews*, 59(4), 103-111.
- Krygier, K., Sosulski, F., & Hogge, L. (1982a). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2), 330-334.
- Krygier, K., Sosulski, F., & Hogge, L. (1982b). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2), 330-334.
- Kudolo, G. B. (2001). The effect of 3-month ingestion of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on pancreatic β -cell function in response to glucose loading in individuals with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of clinical pharmacology*, 41(6), 600-611.
- Labarbe, B., Cheynier, V., Brossaud, F., Souquet, J. -, & Moutounet, M. (1999). Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7), 2719-2723.
- Lairon, D. (2007). Intervention studies on Mediterranean diet and cardiovascular risk. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(10), 1209-1214.
- Larrosa, M., González-Sarriás, A., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2006). Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1611-1620.
- Lean, M. E. J. et al. (1999). Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes*, 48(1), 176-181.

- Manach, C., & Donovan, J. L. (2004). Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free radical research*, 38(8), 771-785.
- Mandalari, G., Bennett, R.N., Kirby, A.R., Lo Curto, R.B., Bisignano, G., Waldron, K.W. & Faulds, C.B. (2006). Enzymatic hydrolysis of flavonoids and pectic oligosaccharides from Bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8307-8313.
- MAPA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. La alimentación en España (2006).
- Mateos, R. et al. (2001). Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2185-2192.
- Mateus, N., Silva, A. M. S., Vercauteren, J., & De Freitas, V. (2001). Occurrence of anthocyanin-derived pigments in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4836-4840.
- Mattila, P., Astola, J. , Kumpulainen, J. (2000). *J. Agric. Food Chem.* 48, 5834
- Maxsón, E.D., Rooney, L.W. (1972) *Cereal Chemistry*, 49, 719.
- Menet, M. -, Sang, S., Yang, C. S., Ho, C. -, & Rosen, R. T. (2004). Analysis of Theaflavins and Thearubigins from Black Tea Extract by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2455-2461.
- Moore, A.B., Francis, F.J., Clydesdale, F.M. (1982) *J. Food Protect.* 45, 738.
- Morabito, N. et al. (2002). Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: A randomized double-blind placebo-controlled study. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(10), 1904-1912.
- Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1-2), 3-20.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (1989). The effect of methanol-ammonia-water treatment on the content of phenolic acids of canola. *Food Chemistry*, 31(2), 159-164.
- Naczki, M., Shahidi, F., & Sullivan, A. (1992). Recovery of rapeseed tannins by various solvent systems. *Food Chemistry*, 45(1), 51-54.
- Nigdikar, S. V., Williams, N. R., Griffin, B. A., & Howard, A. N. (1998). Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low- density lipoproteins to oxidation in vivo. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68(2), 258-265.
- Okuda, T., Yoshida, T., & Hatano, T. (1990). Oligomeric hydrolyzable tannins, a new class of plant polyphenols. *Heterocycles*, 30(2), 1195-1218.

- Okuda, T., Yoshida, T., & Hatano, T. (1989). New methods of analyzing tannins. *Journal of natural products*, 52(1), 1-31.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:4619-26
- Ovaskainen, M. L. et al. (2008). Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *The Journal of Nutrition*, 138(3), 562-566.
- Padilla, F. C., Rincón, A. M., & Bou-Rached, L. (2008). Polyphenol content and antioxidant activity of several seeds and nuts. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 58(3), 303-308.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Salvatore, S., Del Rio, D., Bianchi, M., & Brighenti, F. (2006). Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(11), 1030-1038.
- Pedersen, G. A., Mortensen, G. K., & Larsen, E. H. (1994). Beverages as a source of toxic trace element intake. *Food additives and contaminants*, 11(3), 351-363.
- Peng, S. X., Branch, T. M., & King, S. L. (2001). Fully automated 96-well liquid-liquid extraction for analysis of biological samples by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 73(3), 708-714.
- Perez-Jimenez, J., & Saura-Calixto, F. (2005). Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 5036-5040.
- Phenol-Explorer: Database on polyphenol content in foods. (www.phenol-explorer.eu).
- Pierre, B. et al. (2007). Determination of the polyphenol content of fruits and vegetables. Establishment of a database and estimation of the polyphenol intake in the French diet. *Acta Horticulturae*, 744, 61-70.
- Pietri, S., Maurelli, E., Drieu, K., & Culcasi, M. (1997). Cardioprotective and anti-oxidant effects of the terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (EGb 761). *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29(2), 733-742.
- Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochem. Phytochem.* 1986, 25, 223-30, 25, 223-230.
- Preuss, H. G. et al. (2000). Effects of niacin-bound chromium and grape seed proanthocyanidin extract on the lipid profile of hypercholesterolemic subjects: A pilot study. *Journal of medicine*, 31(5-6), 227-246.
- Price, M.L., Van Scoyoc, S., Butler, L.G.J. (1978). *Agric. Food Chem.* 26,1214.

- Price, R. K., Welch, R. W., Lee-Manion, A. M., Bradbury, I., & Strain, J. J. (2008). Total phenolics and antioxidant potential in plasma and urine of humans after consumption of wheat bran. *Cereal Chemistry*, 85(2), 152-157.
- Prior, R. L., & Gu, L. (2005). Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry*, 66(18 SPEC. ISS.), 2264-2280.
- Prior, R. L., Lazarus, S. A., Cao, G., Muccitelli, H., & Hammerstone, J. F. (2001). Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) Using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1270-1276.
- Psaltopoulou, T., Naska, A., Orfanos, P., Trichopoulos, D., Mountokalakis, T., & Trichopoulou, A. (2004). Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(4), 1012-1018.
- Re R, Pellegrini N, Preoteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 9/ 10: 121-37
- Rechner, A. R. et al. (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(2), 212-225.
- Risso, E. M., Péres, R. G., & Amaya-Farfan, J. (2007). Determination of phenolic acids in coffee by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chemistry*, 105(4), 1578-1582.
- Robins, R. J. (2003) *Agricultural Food Chemistry*, 51, 2866.
- Rodriguez-Arcos, R. C., Smith, A. C., & Waldron, K. W. (2002). Effect of storage on wall-bound phenolics in green asparagus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3197-3203.
- Rodríguez, H., Rivas, B. d. l., Gómez-Cordovés, C., & Muñoz, R. (2008). Degradation of tannic acid by cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum*. *Food Chemistry*, 107(2), 664-670.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 76: 270-76
- Sano, M., Suzuki, M., Miyase, T., Yoshino, K., & Maeda-Yamamoto, M. (1999). Novel antiallergic catechin derivatives isolated from oolong tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), 1906-1910.
- Saura-Calixto, F, Perez-Jimenez, J, Touriño, S., Serrano, J., Fuguet, E., Torres, J.L., Goñi, I. (En prensa). Proanthocyanidins metabolites associated with dietary fibre from in vitro fermentation and metabolites in human plasma. *Molecular Nutrition and Food Research*.

- Saura-Calixto, F., & Goni, I. (2009). Definition of the mediterranean diet based on bioactive compounds. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(2), 145-152.
- Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492-501.
- Saura-Calixto, F., & Goni, I. (2006). Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 94(3), 442-447.
- Saura-Calixto, F., Goni, I., Manas, E., & Abia, R. (1991). Klason lignin, condensed tannins and resistant protein as dietary fibre constituents: Determination in grape pomaces. *Food Chemistry*, 39(3), 299-309.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287-306.
- Selma, M. V., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6485-6501.
- Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A. -, & Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(SUPPL. 2), 310-329.
- Shahidi, F., Naczki, M., Pegg, R. B., & Synowiecki, J. (1991). Chemical composition and nutritional value of processing discards of cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 42(2), 145-151.
- Simopoulos, A. P. (2001). The Mediterranean diets: What is so special about the diet of Greece? The scientific evidence. *Journal of Nutrition*, 131(11 SUPPL.),
- Singleton, V. L. (1981). Naturally occurring food toxicants: phenolic substances of plant origin common in foods. *Advances in Food Research*, 27, 149-242.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Spencer, J. P. E., Chaudry, F., Pannala, A. S., Srai, S. K., Debnam, E., & Rice-Evans, C. (2000). Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochemical and biophysical research communications*, 272(1), 236-241.
- Stan, S. D., Kar, S., Stoner, G. D., & Singh, S. V. (2008). Bioactive food components and cancer risk reduction. *Journal of cellular biochemistry*, 104(1), 339-356.
- Taubert, D., Berkels, R., Roesen, R., & Klaus, W. (2003). Chocolate and Blood Pressure in Elderly Individuals with Isolated Systolic Hypertension [5]. *Journal of the American Medical Association*, 290(8), 1029-1030.

- Thu, N. N. et al. (2004). The polyphenol content and antioxidant activities of the main edible vegetables in Northern Vietnam. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 50(3), 203-210.
- Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C., & Trichopoulos, D. (2003). Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *New England Journal of Medicine*, 348(26), 2599-2608.
- Tomás-Barberán, F. A., Gil, M. I., Cremin, P., Waterhouse, A. L., Hess-Pierce, B., & Kader, A. A. (2001). HPLC - DAD - ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4748-4760.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: Structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18(1), 98-112.
- Francisco A. Tomas-Barberan et al. (2008). Bioavailability, metabolism, and bioactivity of food ellagic acid and related polyphenols. In *Recent Advances in Polyphenol Research, Vol 1; Recent Advances in Polyphenol Research; 23rd International Conference on Polyphenols* (pp. 263-277) AUG 22-25, 2006, Winnipeg, CANADA.
- Tsang, C. et al. (2005). The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *British Journal of Nutrition*, 94(2), 170-181.
- Ullah, M. F., & Khan, M. W. (2008). Food as medicine: Potential therapeutic tendencies of plant derived polyphenolic compounds. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 9(2), 187-196.
- USDA. (2007). USDA, 2007. U.S. Department of Agriculture. Database for the flavonoid content of selected foods. 2007, 131.
- USDA. (2004). USDA, 2004. U.S. Department of Agriculture. Database for the proanthocyanidins content of selected foods. 2004, 33.
- Vincent-Baudry, S. et al. (2005). The Medi-RIVAGE study: Reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-mo intervention with a Mediterranean-type diet or a low-fat diet. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82(5), 964-971.
- Wang, J., Kalt, W., & Sporns, P. (2000). Comparison between HPLC and MALDI-TOF MS analysis of anthocyanins in highbush blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3330-3335.
- Wang, J., & Sporns, P. (1999). Analysis of anthocyanins in red wine and fruit juice using MALDI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(5), 2009-2015.
- Wang, L. -, Meselhy, M. R., Li, Y., Qin, G. -, & Hattori, M. (2000). Human intestinal bacteria capable of transforming secoisolariciresinol diglucoside to mammalian lignans, enterodiols and enterolactone. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48(11), 1606-1610.

- Waterhouse, A. L. (2002). Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 21-36.
- Waterman, E., & Lockwood, B. (2007). Active components and clinical applications of olive oil. *Alternative Medicine Review*, 12(4), 331-342.
- Whitley, A. C., Stoner, G. D., Darby, M. V., & Walle, T. (2003). Intestinal epithelial cell accumulation of the cancer preventive polyphenol ellagic acid - Extensive binding to protein and DNA. *Biochemical pharmacology*, 66(6), 907-915.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 4026-4037.
- Yang, C. S. et al. (2008). Cancer prevention by tea and tea polyphenols. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17(SUPPL. 1), 245-248.
- Young, J. F. et al. (2002). Green tea extract only affects markers of oxidative status postprandially: Lasting antioxidant effect of flavonoid-free diet. *British Journal of Nutrition*, 87(4), 343-355.
- Zafrilla, P., Ferreres, F., & Tomás-Barberán, F. A. (2001). Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3651-3655.